

**Infrarotspektroskopische
Untersuchungen von
Adeninnukleotiden und ihrer
Hydrolyse in wäßriger Lösung**

Michael Matthies

1975

Infrarotspektroskopische Untersuchungen

von Adeninnukleotiden und

ihrer Hydrolyse in wäßriger Lösung

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades des

Fachbereiches Chemie und Pharmazie

der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Michael Matthies

aus Lüdenscheid

München 1975

1. Berichterstatter: Prof.Dr.G.Zundel

2. Berichterstatter: Prof.Dr.G.Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 30.7.1975



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 1972 bis November 1974 im Physikalisch-Chemischen Institut der Universität München angefertigt.

Mein Dank gilt

Herrn Prof.Dr.Georg Zundel,
der das Thema dieser Arbeit anregte, für wertvolle Diskussionen und für sein großzügiges Entgegenkommen bei der Durchführung der Arbeit,

Herrn F.Reim und E.Rupp für die stets schnelle und sorgfältige Ausführung feinmechanischer Arbeiten,

Herrn A.Röhrich für seine Hilfsbereitschaft, besonders bei der Beschaffung von Chemikalien,

Fräulein I.Straub für die unter schwierigen Umständen rasche und sorgfältige Anfertigung des Manuskripts,

der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die teilweise finanzielle Förderung.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhalt

	Seite
1. <u>Einleitung</u>	1
2. <u>Experimenteller Teil</u>	4
2.1 Flüssigkeitsküvette mit konstanter Schichtdicke	4
2.1.1 Thermostatisierung	6
2.1.2 Reproduzierbarkeit der Schichtdicke	7
2.2 Filmküvette	7
2.3 FMIR-Küvette	8
2.4 pH-Messung	8
2.5 Untersuchte Substanzen	9
2.5.1 Käuflich erworbene Ausgangssubstanzen	9
2.5.2 Herstellung des MgATP und MgADP aus den Ba ²⁺ -Verbindungen	10
2.6 Einwaage der Lösungen	11
2.7 Einstellung der Protonierungsstufen	12
2.8 Einstellung des Hydrolysegrades	12
2.9 Tests	14
2.9.1 Kristallwassergehalt	14
2.9.2 Titration	15
2.9.3 UV-Test Adenosin	16
2.9.4 Photometrische Bestimmung der Mg ²⁺ -Konzentration	16
2.9.5 Photometrische Bestimmung der Konzentration von anorganischem Phosphat	17
2.9.6 Enzymatischer Test ATP und ADP/AMP	17
2.10 Korrektur der Extinktionswerte	18
2.11 Aufnahmebedingungen	19
3. <u>Theorie: Die polarisierbaren Wasserstoff-Brücken</u>	21
3.1 IR-Kontinuumsabsorption	21
3.2 Ergebnisse der Untersuchungen an ortho-Phosphat und -Phosphorsäure	25

3.3	ΔpK_a , Symmetrie des Potentials und IR-Kontinuumsabsorption	28
4.	<u>Messungen und Resultate</u>	30
4.1	Protonierung von ATP, ADP und den Mg^{2+} -Komplexen	32
4.2.1	pK_a -Werte und pH-Abhängigkeit der Protonierung	32
4.2.2	Ladungsverteilung im ATP- und ADP-Molekül und Konformation	35
4.2.3	IR-Spektren von ATP	39
4.2.3.1	Bandenzuordnung	44
4.2.4	IR-Kontinuumsabsorption von wäßrigen H_nK_{4-n} ATP-Lösungen ($0 \leq n \leq 4$)	48
4.2.4.1	0% Protonierung	48
4.2.4.2	25% Deprotonierung	51
4.2.4.3	50% Protonierung	52
4.2.4.4	100% Protonierung	54
4.2.4.5	Der Bereich 100 - 200% Protonierung	55
4.2.4.6	Der Bereich 200 - 400% Protonierung	57
4.2.5	IR-Spektren von ADP	58
4.2.6	IR-Kontinuumsabsorption von wäßrigen H_nK_{3-n} ADP-Lösungen ($0 \leq n \leq 3$)	59
4.2.6.1	0 - 100% Protonierung	59
4.2.6.2	100 - 200% Protonierung	62
4.2.6.3	200 - 300% Protonierung	62
4.2.7	Mg^{2+} -Komplexe von ATP und ADP	63
4.2.8	IR-Spektren von MgATP	63
4.2.9	IR-Spektren von MgADP	66
4.2.10	IR-Kontinuumsabsorption von wäßrigen MgK_nH_{2-n} ATP-Lösungen ($0 \leq n \leq 2$)	69
4.2.11	Vergleich des Verlaufs der Untergrund- extinktion für die verschiedenen Sub- stanzen untereinander	70

4.3	IR-spektroskopische Untersuchungen der Hydrolyse von $K_{4-n}H_nATP$ und $MgK_{2-n}H_nATP$ in wäßriger Lösung ($0 \leq n \leq 2$)	72
4.3.1	Abhängigkeit des Hydrolysegrades von der Inkubationszeit	73
4.3.2	Abhängigkeit des pH vom Hydrolysegrad	75
4.3.3	Die Hydrolyse von $K_{4-n}H_nATP$ in wäßriger Lösung	77
4.3.3.1	$n = 0$ Ausgangsprotonierung (K_4ATP)	80
4.3.3.2	$n = 1$ Ausgangsprotonierung (K_3HATP)	89
4.3.3.3	$n = 2$ Ausgangsprotonierung (K_2H_2ATP)	92
4.3.4	Die Hydrolyse von $MgK_{2-n}H_nATP$ in wäßriger Lösung	93
4.3.4.1	$n = 0$ Ausgangsprotonierung (MgK_2ATP)	101
4.3.4.2	$n = 0,5$ ($MgK_{1,5}H_{0,5}ATP$) und $n = 1$ Aus- gangsprotonierung ($MgKHATP$)	103
4.3.4.3	$n = 1,5$ ($MgK_{0,5}H_{1,5}ATP$) und $n = 2$ Aus- gangsprotonierung (MgH_2ATP)	105
4.3.5	Zusammenfassung und Vergleich der Ergeb- nisse der Hydrolysereihen	107
4.3.6	Vergleich mit den früheren Ergebnissen	109
5.	<u>Zusammenfassende Diskussion der Ergeb- nisse und biologische Aspekte</u>	112
6.	<u>Zusammenfassung</u>	118
	<u>Literatur</u>	120

1. Einleitung

Adenosin-5'-triphosphat dient vielen biologischen Prozessen (z. B. aktiver Transport, biochemische Synthese, Muskelkontraktion) als universeller Lieferant freier Enthalpie. Durch die hydrolytische Spaltung der Anhydridbindung des endständigen Phosphats werden unter Standardbedingungen $\Delta G^{\circ} = -7,93 \text{ kcal/mol}$ bei $\text{pH} = 7,00$ (1) frei ⁺):



Ein wesentlicher Teil des für organische Esterbindungen relativ hohen ΔG° -Wertes ("energiereiche Bindung") des ATP läßt sich durch die elektrostatische Abstoßung der negativen Ladungen der Phosphatgruppen (2) (3) und die unterschiedliche Mesomeriestabilisierung von Ausgangs- und Zerfallsprodukten (4) (5) erklären. Außerdem sollen Unterschiede zwischen den Hydratationsenthalpien der Ausgangs- und Endprodukte der Hydrolyse für die Größe der freien Enthalpie verantwortlich sein (6).

Im biologischen Geschehen liegt ATP zu einem hohen Anteil als Komplex mit zweiwertigen Kationen, meist Mg^{2+} oder Ca^{2+} vor (7). Enzyme katalysieren den Zerfall und machen so die freie Enthalpie optimal verfügbar. Die Synthese des ATP aus den Zerfallsprodukten wird in der Zelle ebenfalls enzymatisch katalysiert (Gärung, oxydative Phosphorylierung und Photophosphorylierung).

Sowohl die Einspeisung der im ATP gespeicherten freien Enthalpie als auch die Phosphorylierung von ADP zu ATP sind

⁺) Zur Nomenklatur:

ATP	Adenosin-5'-triphosphat	} ohne Spezifikation des Ladungszustandes
ADP	Adenosin-5'-diphosphat	
P_i	ortho-Phosphat	
MgATP	Mg-Komplex des ATP	
MgADP	Mg-Komplex des ADP	

noch nicht befriedigend geklärt. Von Untersuchungen der nicht-enzymatischen Hydrolyse in wäßrigen Lösungen mit und ohne zweiwertige Kationen (8) (9) (9a) erhofft man sich Aufschluß über Vorgänge, die beim enzymatischen Prozeß ausgenutzt werden.

Die IR-Spektroskopie ist dazu geeignet, den Einfluß von Protonen und Metallionen auf Biomoleküle zu untersuchen (10). Zundel und Mitarbeiter (11) (12) konnten zeigen, daß in wäßrigen Lösungen von Säuren und Basen Wasserstoff-Brücken auftreten, die, - wenn sie von ihrer Umgebung isoliert betrachtet werden -, ein symmetrisches oder annähernd symmetrisches Doppelminimumpotential oder ein breites, flaches Potential besitzen. Sie sind extrem leicht polarisierbar (13) (14) und bewirken durch Wechselwirkungen mit ihrer Umgebung eine kontinuierliche Absorption im infraroten Spektralbereich. So konnten von Seßler (15) $(\text{NH}\cdots\text{N})^+$ -Brücken am Purin, einem Bestandteil des Adenin, nachgewiesen werden. Ebenso treten leicht polarisierbare Wasserstoff-Brücken in wäßrigen Lösungen von ortho-Phosphat auf (16).

Hofmann (17) entwickelt eine Methode, die es gestattet, ohne Enzyme die Vorgänge bei der Hydrolyse von ATP infrarotspektroskopisch zu untersuchen. Sie wurde für die vorliegenden Messungen erweitert. Mit dieser Methode und parallel laufenden pH-Messungen sollten Aussagen gewonnen werden über

- 1) das Auftreten und die Rolle von Wasserstoff-Brücken der Moleküle zum Hydratwasser und untereinander,
- 2) die Verteilung der Protonen auf die Ausgangs- und Zerfallsprodukte bei der hydrolytischen Spaltung,
- 3) den Einfluß der Komplexbildung mit Mg^{2+} .

Dazu wurden im ersten Teil der Arbeit die beteiligten Moleküle mit und ohne Mg^{2+} einzeln in wäßriger Lösung in Abhängigkeit von der Protonierung untersucht (Kap. 4.2).

Die Ergebnisse bilden die Grundlage für die Analyse von hydrolysierendem ATP und MgATP bei verschiedenen Ausgangs-protonierungen (Kap. 4.3). Dabei ergeben sich wechselnde Konzentrationsverhältnisse von Ausgangs- und Zerfallsprodukten. Die Protonenlokalisation und die möglichen Wasserstoff-Brücken-Bindungen sollen dabei besonders betrachtet werden. Im letzten Kapitel werden biologische Aspekte der Ergebnisse diskutiert (Kap. 5).

2. Experimenteller Teil

2.1 Flüssigkeitsküvette mit konstanter Schichtdicke

Die IR-Spektren von wäßrigen Lösungen wurden mit einer Flüssigkeitsküvette aufgenommen, wie sie im Prinzip bei Hofmann (18) beschrieben ist. Sie mußte jedoch in einigen Punkten für meine Messungen abgeändert werden.

Als Fenstermaterial diente polykristallines Silizium⁺), das im gesamten Spektralbereich von 4000 cm^{-1} bis 200 cm^{-1} bis auf einen Ausschnitt von $620 - 600\text{ cm}^{-1}$ hinreichend durchlässig ist (19). Ab etwa 1400 cm^{-1} treten allerdings Banden auf, die von Si-C- und Si-OH-Schwingungen herrühren. Sie müssen mit Siliziumscheiben gleicher Dicke im Vergleichsstrahl kompensiert werden. Dadurch werden gleichzeitig wellenlängenabhängige Reflexionsverluste (20) ausgeglichen.

Die Siliziumscheiben haben einen Durchmesser von 35 mm und eine Dicke von 2 mm. Sie wurden zunächst mit feinem Schleifleinen (400) auf der Poliermaschine vorgepoliert und mit Diamantschleifpaste⁺⁺) abnehmender Körnung (bis $0,25\text{ }\mu\text{m}$) feinpoliert.

Bedingt durch den hohen Brechungsindex des Siliziums ($n = 3,4$) treten bei einer planparallelen Probenschicht kräftige Interferenzen auf, die das Spektrum vollständig verfälschen können. Es wurde deshalb eine keilförmige Vertiefung in die untere Siliziumscheibe geschliffen. Im Mittel betrug die Schichtdicke $12,1\text{ }\mu\text{m}$, was mit Hilfe der Benzolbanden bei 1959 cm^{-1} und 1815 cm^{-1} gemessen werden konnte (21). Durch die Keilform ist allerdings die direkte Proportionalität zwischen Schichtdicke d und Extinktion E , wie sie im Lambertschen Gesetz $E = \epsilon \cdot d$ ausgedrückt ist, nicht mehr gegeben. Die beobachtete Extinktion E_{obs} mußte deshalb korrigiert werden. Für einen idealen Keil ohne parallelen Anteil

⁺) Wacker-Chemie GmbH, Burghausen

⁺⁺) Winter-Dioplast, Hamburg

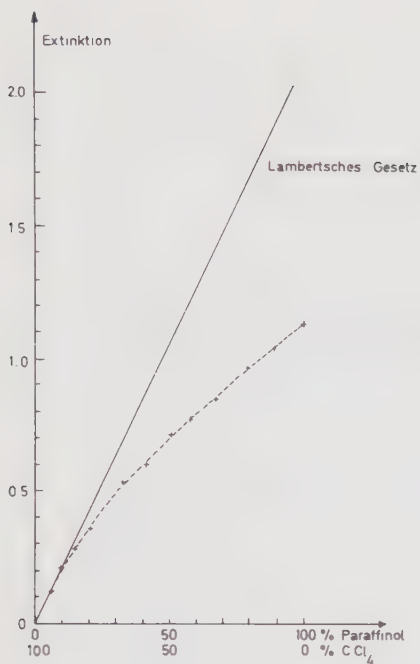


Abb. 1 : Abweichung der Extinktion vom Lambertschen Gesetz durch Keilform der Si-Küvette

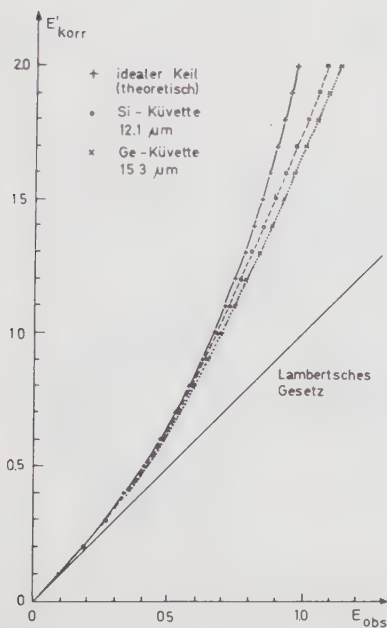


Abb. 2 : Eichkurven für verschiedene Küvetten

in der durchstrahlten Schicht wurde von Hayd (22) ein analytischer Ausdruck angegeben:

$$E_{\text{obs}} = E_{\text{kor}}' - 0,4343 \ln \frac{\sinh 2,3026 E_{\text{kor}}'}{2,3026 E_{\text{kor}}'} \quad \text{Gl. 1}$$

Da die reale Form der Keilschicht nicht bekannt ist, wurde experimentell ein Zusammenhang zwischen E_{obs} und E_{kor}' ermittelt. Voraussetzung ist, daß das Beersche Gesetz $E = \epsilon \cdot c$ gilt. Das ist z. B. bei einer Mischung von Paraffinöl und Tetrachlorkohlenstoff der Fall.

Es wird die Bande bei 2940 cm^{-1} des Paraffinöls zur Eichung herangezogen, da CCl_4 in diesem Spektralbereich keine Banden aufweist. Die Extinktion dieser Bande bei verschiedenen Mischungsverhältnissen Paraffinöl: CCl_4 wird gemessen (Abb. 1). Aus der Abweichung der Kurve von der linearen Beziehung des Lambert-Beerschen Gesetzes ergibt sich die Korrekturkurve in Abb. 2. Man sieht, daß bei den verwendeten Küvetten zumindest im Bereich $E \leq 0,3$ die gemessene Extinktion nicht wesentlich vom Lambert-Beerschen Gesetz abweicht.

2.1.1 Thermostatisierung

Die Proben wurden mit Hilfe eines Kühlthermostaten auf 10°C thermostatisiert. Die Temperatur wurde durch einen nahe der Si-Scheibe in das Küvettenmaterial eingebauten temperaturabhängigen Widerstand ⁺) direkt am Ort der Probe gemessen ⁺⁺). Zwischen der Temperatur des Thermostatbades und der der Probe bestand ein Temperaturgefälle von ca. 4°C . Die Temperatur wurde auf $\pm 0,1^\circ\text{C}$ konstant gehalten. Die Vergleichsküvette wurde im gleichen Kühlkreislauf thermostatisiert.

⁺) Heraeus W.C. GmbH, Hanau

⁺⁺)PTR-Regler, Landau

Die Temperatur von 10°C verhindert weitgehend, daß die Proben während der Registrierung des Spektrums hydrolysieren. Messungen vor und nach der Spektrenaufnahme ergaben keinen signifikanten Unterschied im Hydrolysegrad.

2.1.2 Reproduzierbarkeit der Schichtdicke

Die Nulllinie der Küvette zeigt von 4000 - 1000 cm^{-1} eine sehr gute Konstanz (Schwankungen $\leq 5\%$ Transmission). Unterhalb von 1000 cm^{-1} liegt die Schwankungsbreite im Bereich von 10% Transmission. Streuung konnte durch gutes Polieren der Fenster weitgehend beseitigt werden.

Durch eine Dreipunktauflage ist eine Reproduzierbarkeit der Schichtdicke von $\pm 1\%$ gewährleistet. Sie wurde mit Hilfe der Benzolbanden bei 1959 cm^{-1} und 1815 cm^{-1} kontrolliert.

2.2 Filmküvette

Für Untersuchungen an Filmen im Bereich $\leq 650 \text{ cm}^{-1}$ wurde die von Zundel et al. (23) entwickelte Küvette umgebaut. Für das Einfallfenster wurde Polyäthylen (Lupolen⁺) verwendet, das von 714 - 10 cm^{-1} infrarotdurchlässig ist (24). Zur Vermeidung von Interferenzen wurde auf einer Seite mit einem Drahtnetz unter kurzzeitigem Druck von 100 atü eine Struktur eingepreßt. Das Einlaßfenster diente gleichzeitig als Probenträger. Auf einer Siliziumscheibe mit Zylinderschliff ist ein Quarzrähmchen aufgeklebt. Durch einen Viton-Ring wird der Probenraum abgedichtet (Abb. 3).



Abb. 3: Probenträger
für Filme

Die Substanzen wurden im Zentrifugenbecher nach Hofmann und Zundel (25) getrocknet. Probenmessungen zeigten die Verwendbarkeit dieser Küvette für den Spektralbereich unterhalb 650 cm^{-1} .

⁺) BASF, Ludwigshafen

2.3 FMIR-Küvette

Transmissionsspektren von wäßrigen Lösungen zeigen starke Absorption der H_2O -Banden. Sie läßt sich durch die Verwendung der FMIR-Methode vermeiden (26)-(28). Spektren, die nach dieser Methode aufgenommen werden, unterscheiden sich nur geringfügig von Absorptionsspektren. Für Messungen unterhalb 800 cm^{-1} wurde eine Küvette verwendet, wie sie auch von Zerfowski (29) benutzt wird. An Stelle des Germanium-Kristalls wurde ein Ag_2Br -Kristall eingesetzt ($\varphi = 60^\circ$, 18 Reflexionen). Da Ag_2Br geringfügige Banden in diesem Spektralbereich hat, mußte ein zweiter FMIR-Zusatz im Vergleichsstrahlengang eingesetzt werden. Es wurden keine exakten Messungen mit dieser Küvette durchgeführt.

2.4 pH-Messung

Parallel zu den IR-Spektren sollte der pH gemessen werden. Da für jede Messung nur einige μl zur Verfügung standen, wurde ein Mikrokapillar-pH-Meßgerät ⁺) verwendet. Dabei wird über eine Polyäthylen-Kapillare mit Unterdruck die Probe angesaugt. Es reichen $20\text{ }\mu l$. Die Elektroden waren auf $10^\circ C$ thermostatisiert. Die Temperatur wurde am Ort der Probe gemessen. Das pH-Meßgerät wurde mit Eichpuffern der Fa. Ingold auf $\pm 0,02$ pH-Einheiten geeicht.

⁺) Dr.W.Ingold, Zürich, Frankfurt/Main

2.5 Untersuchte Substanzen

2.5.1 Käuflich erworbene Ausgangssubstanzen

Folgende Substanzen wurden käuflich erworben:

(S1) K_2H_2ATP	Sigma Chem.Comp.St.Louis,, U.S.A.
(S2) Na_2H_2ATP	Boehringer Mannheim
(S3) Ba_2ATP	Sigma Chem.Comp.St.Louis, U.S.A.
(S4) BaH_2ATP	Merck Darmstadt (wird nicht mehr geliefert)
(S5) ${}^uMg_2{}^nATP$	K & K Laboratories (über Serva, Heidelberg)
(S6) $MgATP$	BDH Chem.Ltd., Poole, England
(S7) $Mg_{1,5}ATP$	Sigma Chem.Comp.St.Louis, U.S.A.
(S8) H_3ADP	Boehringer Mannheim
(S9) Ba_3ADP_2	Sigma Chem.Comp.St.Louis, U.S.A.

Die käuflich erhältlichen Mg-Verbindungen des ATP sind entweder mit Stabilisatoren vermischt (S6) oder variieren im Ionengehalt (S7), insbesondere im Mg-Gehalt (S5). Hofmann (17) verwendete das "Di-Mg"-Salz des ATP von K & K (S5) zur Herstellung seiner Proben. Durch Untersuchungen mit der Atomabsorptions-Spektroskopie (AAS) und mit photometrischen (PhM) Messungen (s.Kap. 2.9.4) stellte sich heraus, daß bei dem uns gelieferten "Di-Mg"-Salz etwa folgende Ionenzusammensetzung vorlag:

Lieferung vom	Mg^{2+} (AAS)	Mg^{2+} (PhM)	Na^+ (AAS)	K^+ (AAS)	Ca^{2+} (AAS)
20.3.72	0.88	0.9	0.09	Spuren	0.05
5.4.72	0.84	0.87	0.09	Spuren	0.05

Angaben jeweils Mol Kation/Mol ATP

Soll: 2 Mol Mg^{2+} /ATP

Die restlichen zwei Ladungen des ATP sind mit Protonen besetzt. Es lag also in Wirklichkeit bei Hofmann (17) als Ausgangssubstanz ein MgH_2ATP -Salz mit Verunreinigungen von

Na^+ und Ca^{2+} vor. In H_2O gelöst war die Substanz außerdem bereits ca. 18% hydrolysiert. Auch das Mg-Salz von Sigma (S7) zeigte bereits einen Zerfall von 15%. Da also alle angebotenen Mg-Verbindungen nicht den Anforderungen bzgl. Reinheit entsprachen, wurde eine Methode entwickelt, MgATP und MgADP aus den sehr reinen und stabilen Ba-Salzen (S3, S4, S9) herzustellen. Die übrigen Substanzen wurden ohne weitere Reinigung verwendet.

2.5.2 Herstellung des MgATP und MgADP aus den Ba^{2+} -Verbindungen

Durch Zugabe äquivalenter Mengen 1 M Lösung von MgSO_4 zum Ba-Salz der Nukleosid-Phosphate (30) lassen sich die entsprechenden Mg-Verbindungen herstellen. Das unlösliche BaSO_4 fällt aus und kann abzentrifugiert werden.

Das zunächst als Ausgangssubstanz verwendete BaH_2ATP der Fa. Merck stellte sich als bereits zu stark hydrolysiert heraus (ca. 15% Zerfall). Deshalb wurden Ba_2ATP und Ba_3ADP_2 von Sigma genommen. Die Tests (s. Kap. 2.9) zeigten, daß diese Substanzen sehr rein und wenig zerfallen waren.

Es wird hier nur die Gewinnung von MgATP beschrieben, diejenige von MgADP erfolgt analog. ATP ist nur schlecht löslich in H_2O mit einem Gehalt von mehr als 1 Mol Mg^{2+} pro ATP. Deshalb wurde MgH_2ATP durch Zugabe äquivalenter Mengen MgSO_4 und H_2SO_4 hergestellt. Um eine möglichst quantitative Ausbeute zu erhalten, wurde mit einem Überschuß (20%) von Ba_2ATP und in stark verdünnten Lösungen (31) gearbeitet. Der Umsatz erfolgte nach zwei Methoden:

- 1) Zum Gemisch der Sulfat-Lösungen wurden portionsweise einige mg Ba_2ATP eingestreut und jeweils 30 min gemischt, bis alles umgesetzt war. Dann wurde 24 Stunden bei 0°C geschüttelt. Der Niederschlag wurde in 10 min bei 5°C abzentrifugiert.

2) Durch Behandlung mit Ultraschall ⁺) erreicht man eine kleinere Korngröße und damit einen besseren Umsatz. Das Ba-Salz wurde zunächst in H_2O 2 x 1/2 min mit 1 min Pause bei Stufe 4 behandelt, dann die entsprechende Lösungsmenge $HgSO_4$ und H_2SO_4 in 2 Teilen dazugegeben und jeweils 5 x 1/2 min mit 1 min Pause bei Stufe 4 beschallt. Anschließend wurde bei $5^{\circ}C$ 10 min zentrifugiert.

Die Lösung wurde auf Sulfat- und Ba^{2+} -Ionen getestet. Da nur einige μl zur Verfügung standen, erfolgte eine Tüpfelanalyse nach Feigl (32). $BaSO_4$ schließt $KMnO_4$ ein, was zum Farbnachweis sowohl von Ba^{2+} -Ionen als auch von Sulfat-Ionen dienen kann. Die Erfassungsgrenze liegt bei $5 \mu g Ba^{2+}$ oder 1:10000 bzw. $2,5 \mu g SO_4^{2-}$ oder 1:20000 Grenzkonzentration.

Falls noch Sulfat-Ionen in der Lösung vorhanden waren, wurde Ba_2ATP erneut eingestreut und der Bodensatz abzentrifugiert (entsprechend beim Nachweis von Ba^{2+}). Das erfolgte solange, bis keine SO_4^{2-} - bzw. Ba^{2+} -Ionen nachgewiesen werden konnten. Die Lösung wurde eingefroren und in 24 Stunden gefriergetrocknet. Anschließend erfolgten die Tests (s.Kap. 2.9) zur Überprüfung der Reinheit. Es wurde zusätzlich eine Elementaranalyse (s. Kap. 2.9.1) auf Schwefel durchgeführt. Die gemessenen Gewichtsanteile lagen im Promillebereich.

2.6 Einwaage der Lösungen

Die Lösungen mit der niedrigen Konzentration (0,25 M) wurden unter Verwendung geeichter Meßkolben eingewogen. - Zur Untersuchung der Kontinuumsabsorption (s.Kap. 3) waren aber möglichst hohe Konzentrationen erforderlich. Da nur wenig Substanz zur Verfügung stand, wurde auf folgende Weise vorgegangen: Es wurde zunächst die Menge H_2O ermittelt, bei der die Sättigungskonzentration erreicht war. Mit diesem H_2O/ATP -Verhältnis wurden die Lösungen hergestellt und auf die entsprechende Molarität umgerechnet. Dazu mußte die Dichte ρ gemessen werden. Das geschah mit einer 10 μl -Eppendorf-Pipettenspitze. Der Fehler lag unter 1%. Es gilt dann für die Molarität c_i

⁺) BRANSON Sonic Power

der i-ten Protonierungsstufe

$$c_i = \frac{e_i}{(M_0 + n_{H_2O} \cdot M_{H_2O}) \cdot 1000} \quad \text{Gl. 2}$$

mit M_0 = Molekulargewicht der Substanz ohne Kristallwasser

n_{H_2O} = Anzahl der H_2O -Moleküle pro Mol Substanz

M_{H_2O} = Molekulargewicht von Wasser

Bei allen untersuchten Substanzen wurde das K^+ -Salz verwendet. Es ist besser löslich als das Na^+ -Salz, das von den meisten Autoren untersucht wurde (18)(64)(71). Die Löslichkeit nimmt in der Reihenfolge



ab.

2.7 Einstellung der Protonierungsstufen

Als Ausgangssubstanz für die ATP-Reihen dienten das K_2H_2ATP -Salz und das MgH_2ATP (das entspricht 200% Protonierung), für die ADP-Reihen die freie Säure (i.e. 300% Protonierung) und das $MgHADP$ (i.e. 100% Protonierung). Durch Zugabe äquivalenter Mengen KOH konnten die anderen Protonierungsstufen hergestellt werden. Das 300% und 400% protonierte ATP sowie das 200% protonierte $MgADP$ wurden durch Zugabe von entsprechenden Volumenanteilen 6 N HCl hergestellt. Die dazwischenliegenden Stufen wurden durch Mischen entsprechender Anteile der äquimolaren Lösungen gewonnen. Die Lösungen wurden titrimetrisch überprüft (s. Kap. 2.9.2).

2.8 Einstellung des Hydrolysegrades

In biologischen Systemen, wo ATP als Energieüberträger fungiert, katalysieren Enzyme (ATPasen) den Zerfall des

ATP (33). Miller und Westheimer (9) bestimmten die nicht-enzymatische Geschwindigkeitskonstante der Hydrolyse (d. h. den Zerfall pro Zeiteinheit) bei 95°C. Sie liegt in der Größenordnung von 10^5 sec^{-1} . (In Kap. 4.3.1 wird die Abhängigkeit der Zerfallsgeschwindigkeiten von Protonierung und Mg-Komplexbildung diskutiert)

Für die Untersuchung der Wechselwirkung zwischen den Zerfallsprodukten bei der Hydrolyse ist die Einstellung verschiedener Hydrolysegrade notwendig. Der Hydrolysegrad α ist definiert als

$$\alpha = \left[1 - \frac{[\text{ATP}]'}{[\text{ATP}]^0} \right] \cdot 100\% \quad \text{Gl. 3}$$

mit $[\text{ATP}]^0$ = Konzentration des ATP vor dem Zerfall
 $[\text{ATP}]'$ = Konzentration des ATP nach dem Zerfall

Der Hydrolysegrad α gibt also an, wieviel Prozent des ursprünglich vorhandenen ATP zerfallen sind. Durch regelmäßige Messungen von allen Zerfallsprodukten $[\text{ADP}]$, $[\text{AMP}]$, $[\text{P}_i]$ und $[\text{ATP}]'$ konnte festgestellt werden, daß fast nur ortho-Phosphat-Hydrolyse stattfindet. Dann gilt auch für den Hydrolysegrad

$$\alpha = \frac{[\text{P}_i]}{[\text{ATP}]^0} \cdot 100\% . \quad \text{Gl. 4}$$

Hofmann (17) (34) gibt ein Verfahren an, das gestattet, durch Inkubation im Wärmeschrank bei 40°C verschiedene Hydrolysegrade einzustellen. Die Proben werden jeweils nach 24 Stunden dem geschlossenen Gefäß entnommen, der Hydrolysegrad bestimmt (s. Kap. 2.9.5 und 2.9.6) und ein IR-Spektrum aufgenommen.

Bei der Meßreihe mit der niedrigen Konzentration wurde auf die gleiche Weise vorgegangen (s. Kap. 4.3.4). Die Inkubationszeit wurde kürzer gewählt, um geringere Hydrolysegrad-Unterschiede zwischen den Spektren zu erhalten.

Messungen von Hofmann (17)(35) ließen darauf schließen, daß in engen Hydrolysegradbereichen große Hydratstrukturänderungen auftreten. Es wurde etwa alle 5% Zerfall ein Spektrum aufgenommen. Durch die Verwendung von jeweils frisch hergestelltem MgATP (s. Kap. 2.5.2) konnte bei ca. 3% Zerfall die Meßreihe begonnen werden. Bei der Meßreihe mit der höheren Konzentration (Kap. 4.3.3 und 4.3.4) wurde für jede Messung ein Probengläschen abgefüllt und verschieden lange im Wärmeschrank belassen. Dies Verfahren hatte den Vorteil, die Lösung nach der Probenentnahme einzufrieren und später Kontrollmessungen durchführen zu können. Die Zerfallsgeschwindigkeit ist abhängig von Temperatur, pH und Mg^{2+} -Konzentration. Eine Erhöhung der Temperatur von 37°C auf 48°C gibt fast eine Verdoppelung des Zerfalls. Eine eingehende Diskussion erfolgt im Kap. 4.3.1.

2.9 Tests

2.9.1 Kristallwassergehalt

Der Kristallwassergehalt der käuflich erworbenen Substanzen und des gefriergetrockneten MgH_2ATP und $MgHADP$ wurde auf drei verschiedene Arten ermittelt:

- 1) Es werden a mg der Substanz in H_2O gelöst und auf das Volumen V aufgefüllt. Mit Hilfe des UV-Tests auf Adenosin (s. Kap. 2.9.3) wird die Konzentration c gemessen. Dann gilt:

$$c = \frac{a}{(M_o + n_{krist} \cdot M_{H_2O}) V} \quad \text{Gl. 5}$$

Da alle Größen außer der Anzahl Mole Kristallwasser n_{krist} bekannt sind (M_o = Molekulargewicht der Substanz ohne Kristallwasser), kann n_{krist} daraus berechnet werden:

$$n_{krist} = \frac{1}{M_{H_2O}} \left(\frac{a}{V \cdot c} - M_o \right) \quad \text{Gl. 6}$$

- 2) Die Konzentration c kann auch durch Titration bestimmt werden (s. Kap. 2.9.2). Für den Kristallwassergehalt gelten dann die gleichen Beziehungen wie in 1).
- 3) Eine dritte Möglichkeit zur Bestimmung des Kristallwassergehaltes ergibt sich aus der Elementaranalyse. Aus dem prozentualen Gehalt an Kohlenstoff G_C ergibt sich

$$n_{\text{krist}} = \frac{M_O}{M_{H_2O}} \left(\frac{n_C}{G_C} \frac{M_C}{M_O} - 1 \right) \quad \begin{array}{l} n_C = 10 \\ M_C = 12 \end{array} \quad \text{Gl. 7}$$

Ebenso erhält man aus dem Stickstoff-Anteil G_N

$$n_{\text{krist}} = \frac{M_O}{M_{H_2O}} \left(\frac{n_N}{G_N} \frac{M_N}{M_O} - 1 \right) \quad \begin{array}{l} n_N = 5 \\ M_N = 14 \end{array} \quad \text{Gl. 8}$$

und dem Wasserstoff-Gehalt G_H

$$n_{\text{krist}} = \frac{n_H - M_O \cdot G_H}{M_{H_2O} \cdot G_H - 2} \quad n_H = 14 \quad \text{Gl. 9}$$

Die gemessenen Werte differierten um 0,5 Mole Kristallwasser. Aus ihnen wurde der Mittelwert gebildet.

2.9.2 Titration

Zur Überprüfung der H^+ -Ionenkonzentration der Protonierungsstufen (s. Kap. 2.7) sowie zur Bestimmung des Kristallwassergehaltes (s. Kap. 2.9.1) wurden jeweils Proben der eingewogenen Lösungen verdünnt und mit 0,01 N NaOH titriert. Indikator war Phenolphthalein. Das Verfahren eignet sich natürlich nur für Säuren und saure Salze. Es ist dafür die genaueste Methode.

2.9.3 UV-Test Adenosin

Die π -Elektronensysteme der Nukleotide absorbieren im UV bei ca. 260 nm (36) (37). Das läßt sich zur Bestimmung der Gesamtkonzentration aller Adenin-Nukleotide ausnützen. Es gilt ⁺⁺):

$$c = \frac{E_{\max} \cdot 1000 \cdot V}{\epsilon \cdot d \cdot v} \quad \text{Mol} \quad \text{Gl. 10}$$

Mit $\epsilon = 15,4 \frac{\text{cm}^2}{\mu\text{Mol}}$ (es wurde auf pH = 7,00 gepuffert), einer Verdünnung von 1:10 000 und $d = 0,5 \text{ cm}$ ergibt sich

$$c = \frac{E_{\max} \cdot 10}{7,7} \quad \text{Mol.}$$

Das Extinktionsmaximum $E_{\max}$ liegt bei 259 nm.

2.9.4 Photometrische Bestimmung der Mg^{2+} -Konzentration

Magnesium bildet mit einem Azofarbstoff ⁺) in Alkohol im pH-Bereich 9 - 10 einen löslichen roten Farbkomplex, dessen Farbintensität zur quantitativen Bestimmung der Mg^{2+} -Konzentration herangezogen werden kann. Die Verdünnung muß so gewählt werden, daß die gemessenen Konzentrationen unter 3 mmol/l liegen. Die Extinktion der Analysen- und der Standardprobe werden gegen eine Blindlösung bei 505 nm gemessen und dann miteinander verglichen. Für die Mg^{2+} -Konzentration ergibt sich daraus:

$$[\text{Mg}^{2+}] = \frac{E_A}{E_S} \quad 0,82 \quad \frac{V}{v} \quad \frac{\text{mMol}}{1} \quad \text{Gl. 11}$$

⁺) Merckotest, Fa. Merck AG. Darmstadt

⁺⁺) V = Testvolumen (ml)

v = Probevolumen im Test (ml)

2.9.5 Photometrische Bestimmung der Konzentration von anorganischem Phosphat

Zur Bestimmung der Konzentration des ortho-Phosphats $[P_i]$, das bei der Hydrolyse abgespalten wird, diente der optische Test auf Molybdänblau (37) ⁺). Das Extinktionsmaximum liegt bei 750 nm. Die Phosphorkonzentration $[P]$ ergibt sich dann aus der Extinktion der Analysenprobe E_A und der der Standardprobe E_S als

$$\begin{aligned}
 [P] &= \frac{E_A}{E_S} \cdot 5 \cdot \frac{V}{v} \cdot \frac{\text{mg}}{100 \text{ ml}} \\
 &= \frac{E_A}{E_S} \cdot 1,615 \cdot \frac{V}{v} \cdot \frac{\text{mmol}}{l} \quad \text{Gl. 12}
 \end{aligned}$$

Das entspricht der Konzentration an anorganischem Phosphat. Daraus läßt sich, wie in Kap. 2.8 gezeigt, der Hydrolysegrad bestimmen.

2.9.6 Enzymatischer Test ATP und ADP/AMP

Der Hydrolysegrad kann auch aus der Konzentration des noch vorhandenen ATP und des gebildeten ADP und AMP bestimmt werden. Außerdem läßt sich daraus feststellen, inwieweit die pyro-Phosphat-Hydrolyse neben der ortho-Phosphat-Hydrolyse (s. Kap. 2.8) begünstigt ist. Sie tritt erst ab ca. 80% Hydrolysegrad in Erscheinung und spielt auch ab da nur eine untergeordnete Rolle (1 - 2% Anteil). Die Konzentration der Adenin-Nukleotide wurde mit dem optischen Test nach Warburg (38) (39) bestimmt ⁺⁺). Jeweils 10 μ l Lösung wurden der Probe mit einer 10 μ l-Spritze ⁺⁺⁺) entnommen, verdünnt und nach Vorschrift umgesetzt. Die Enteiweißung entfiel.

⁺) Fa. Merck AG, Darmstadt

⁺⁺) Fa. Boehringer GmbH, Mannheim

⁺⁺⁺) Glenco, Houston, Texas, U.S.A.

Es wird stöchiometrisch NADH gebildet, dessen Extinktion bei 366 nm gemessen wird. Aus der Extinktionsdifferenz ΔE vor und nach Zugabe des Enzyms ergibt sich, bei Berücksichtigung der Verdünnung, eine Konzentration an ATP von

$$\underline{\text{ATP:}} \quad c = 1,83 \quad \Delta E \text{ Mol/l} . \quad \text{Gl. 13}$$

Entsprechend erhält man die Konzentration von ADP und AMP:

$$\underline{\text{ADP:}} \quad c = 0,74 \quad (E_1 - E_2) \text{ Mol/l} \quad \text{Gl. 14}$$

$$\underline{\text{AMP:}} \quad c = 0,37 \quad (E_2 - E_3) \text{ Mol/l} \quad \text{Gl. 15}$$

Der Fehler beträgt nach Angaben des Herstellerwerkes 1 - 2%.

2.10 Korrektur der Extinktionswerte

Veränderungen der Untergrundextinktion wurden bei 1900 cm^{-1} und 1400 cm^{-1} ausgemessen. Da nur der Beitrag der gelösten Substanz und nicht der des Lösungsmittels (hier H_2O) interessiert, mußte vom gemessenen Extinktionswert der Anteil des Wassers abgezogen werden. Unterschiede in der Molarität, durch Einwaage, Protonierung und Hydrolyse hervorgerufen, mußten ebenfalls berücksichtigt werden. Als Bezugswert diente jeweils die Molarität der unprotonierten Substanz. Es ergibt sich dann, zusätzlich zur Korrektur E'_{korr} von Kap. 2.1, für die i -te Protonierungsstufe folgender Ausdruck:

$$E'_{i,\text{korr}} = \frac{c_0}{c_i} \left(E'_{i,\text{korr}} - \frac{c_{i,\text{H}_2\text{O}}}{55,5} E'_{\text{korr},\text{H}_2\text{O}} \right) \quad \text{Gl. 16}$$

mit c_0 = Molarität der unprotonierten Substanz

c_i = Molarität der i -fach protonierten Substanz

$c_{i,\text{H}_2\text{O}}$ = Anzahl der Mole H_2O pro l in der Lösung

wobei sich c_{i,H_2O} aus

$$c_{i,H_2O} = \frac{1}{M_{H_2O}} (e_i - M_o c_i) \quad \text{Gl. 17} \quad \text{berechnet.}$$

2.11 Aufnahmebedingungen

Es wurden mit dem IR-Gitter-Spektrometer 325 der Fa. Perkin-Elmer Spektren im gesamten mit diesem Gerät zugänglichen Spektralbereich von $4000 - 200 \text{ cm}^{-1}$ aufgenommen. Da im Laufe der Messungen ein Umbau des Gerätes vom Thermoelement auf eine TGS-Zelle nötig wurde, änderten sich die Aufnahmebedingungen etwas. Es konnte aber kein Einfluß auf die Spektren festgestellt werden. Unterhalb 1000 cm^{-1} ist die Eigenstrahlung der Küvettenfenster und der Probe nicht mehr zu vernachlässigen. Beim Gitterspektrometer PE 325 besteht die Möglichkeit, diese Eigenstrahlung durch eine Aufnahme mit gekreuzten Choppern zu eliminieren (39a). Dabei tritt während 90° einer Umdrehung der Chopper keine IR-Strahlung durch die Küvetten, so daß am Detektor nur die Eigenstrahlung registriert und elektronisch eliminiert wird. Im Mittel bleibt dadurch aber weniger Intensität für die Absorptionsmessung übrig, so daß mit größerer Verstärkung registriert werden mußte. Mit gekreuzten Choppern ergab sich unter 1000 cm^{-1} eine deutliche Absenkung der Extinktion von H_2O gegenüber parallelen Choppern. Bei 1000 cm^{-1} mußte ebenfalls die Balance des Gerätes neu eingestellt werden. Dabei stellte sich heraus, daß die Balance unterhalb 1000 cm^{-1} nicht konstant ist, sondern nach 0% Transmission wegdriftet. Nach Rücksprache mit dem Herstellerwerk stellte sich der Effekt als Apparatefehler heraus ⁺). Um reproduzierbare Messungen zu erhalten, wurde bei 4000 cm^{-1} und bei 1000 cm^{-1} die Balance eingestellt. Es wurde mit folgenden Daten registriert:

⁺) Lt. Information des Werkes wird z.Zt. an der Beseitigung des Fehlers gearbeitet.

Mit Thermoelement als Detektor:

Spalt-Progr. Verstärkg. Geschw.

4000 - 1000 cm^{-1}	6,5	4	1
1000 - 200 cm^{-1}	6,5	7	1

Mit TGS-Zelle als Detektor:

4000 - 1000 cm^{-1}	6,5	1,6	1
1000 - 200 cm^{-1}	6,5	2,4	1

Die Nulllinie der Küvette zeigt von 4000 - 1000 cm^{-1} eine sehr gute Konstanz (Schwankungen $\leq 5\%$ Transmission). Unterhalb von 1000 cm^{-1} liegt die Schwankungsbreite im Bereich von 10% Transmission.

3. Theorie: Die polarisierbaren Wasserstoff-Brücken

3.1 IR-Kontinuumsabsorption

An einer Vielzahl von Systemen wurde eine kontinuierliche Absorption im infraroten Grund- und Oberschwingungsbereich (11), (12), (40) - (45) beobachtet. Sie tritt in sauren (45) und basischen (42) Lösungen sowie in hydrierten Filmen von Polyelektrolyten auf (11) und wird bewirkt durch Wasserstoff-Brücken, die, - wenn sie von ihrer Umgebung isoliert sind -, ein symmetrisches oder nahezu symmetrisches Doppelminimumpotential oder ein breites, flaches Potential haben.

Symmetrisches Potential

Einer Wasserstoff-Brücke zwischen einem Donor A und einem Akzeptor B, die durch die zwei Grenzstrukturen



beschrieben werden kann, läßt sich ein Potential für die Bewegung des Protons zuschreiben. So geht z. B. aus Neutronenbeugungsexperimenten (46) und IR-Untersuchungen (11) (45) hervor, daß bei der Gruppe $H_5O_2^+$, beschrieben durch die zwei Grenzstrukturen



ein im zeitlichen Mittel symmetrisches Potential vorliegt. Ebenso ist das der Fall in der Gruppierung $H_3O_2^-$:



Berechnungen von Weidemann und Zundel (13) (14) zeigten, daß das Proton in solchen Brücken fluktuiert. Die Polarisierbarkeit (10^{-22} cm^3) liegt um 2 Größenordnungen über derjenigen von Elektronensystemen.

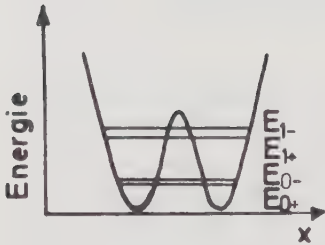


Abb. 4: Energieniveaus im Doppelminimumpotential

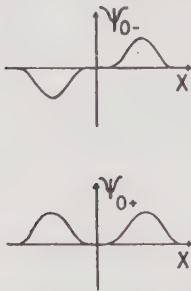


Abb. 5: Wellenfunktionen des Grund- und ersten angeregten Zustandes

Das beruht auf folgender Tatsache: In einem Potential, wie es Abb. 4 zeigt, ist die Zustandsfunktion ψ_{0+} des Grundzustandes symmetrisch, die des ersten angeregten Zustandes antisymmetrisch ψ_{0-} (Abb. 5). Da die Energieniveaus sehr nahe beieinander liegen, genügt bereits ein kleines elektrisches Feld, um dem Grundzustand den ersten angeregten Zustand beizumischen. Dadurch ergibt sich eine unsymmetrische Ladungsverteilung d. h. eine extrem große Polarisierbarkeit dieser Brücken (14). Durch Wechselwirkungen mit der Umgebung wird das Potential stark deformiert und damit unsymmetrisch. Dadurch verschieben sich die Energieniveaus. Wie wirkt nun die Umgebung auf solche Brücken ein? Es lassen sich drei Effekte voneinander unterscheiden:

1) Protonendispersionskräfte

Die leicht polarisierbaren Wasserstoff-Brücken können nach Art der van der Waals-Kräfte untereinander wechselwirken. Die Brücken beeinflussen sich also gegenseitig, wobei die Korrelationskräfte vom Abstand und der Orientierung der Brücken zueinander abhängen. Diese Wechselwirkung spielt insbesondere bei ungeladenen Wasserstoff-Brücken eine Rolle.

2) Induktionswechselwirkungen

Bei geladenen Wasserstoff-Brücken ist die Polarisierbarkeit der Grund für kräftige Wechselwirkungen zwischen diesen Brücken über Induktionskräfte. Weiterhin verursacht sie eine induzierte

Dipol-Wechselwirkung dieser Brücken mit den Ionenfeldern und den Dipolfeldern der Solvatmoleküle. Die mittlere Stärke solcher elektrischer Felder liegt in der Größenordnung von 10^7 V/cm (11). Abb. 6 zeigt, daß die Aufspaltungen der Energieniveaus bis zu 1000 Wellenzahlen hervorrufen. Weiter kann man erkennen, daß das untere

Energieniveau abgesenkt wird, d. h. es handelt sich um Anziehungskräfte.

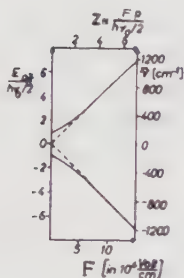


Abb. 6: Verschiebung der Energieniveaus E_{0+} und E_{0-} eines fluktuierenden Protons durch ein elektrisches Feld aus (13)

3) Kopplung der Protonenübergänge in der Brücke mit zwischenmolekularen Schwingungen

Die Übergänge in der Brücke können mit den Übergangsmomenten der zwischenmolekularen Schwingungen, z. B. der Torsionsschwingung der Solvatmoleküle, koppeln.

Durch all diese Wechselwirkungseffekte sind die Energieniveaus in den einzelnen Brücken stets mehr oder weniger stark verschoben. Dadurch entsteht eine Vielfalt möglicher Energiezustände und eine Kontinuität von Energieniveaudifferenzen, welche im IR-Spektrum von Systemen mit solchen Wasserstoff-Brücken als kontinuierliche Absorption beobachtet wird. Sie erstreckt sich von etwa 3500 cm^{-1} zu kleineren Wellenzahlen.

Die Kontinuumsabsorption ist also eine Folgeerscheinung der Wechselwirkung von leicht polarisierbaren Wasserstoff-

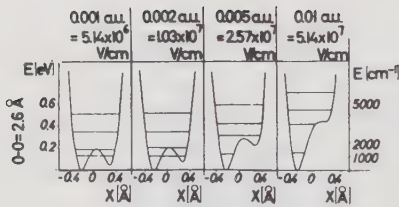


Abb. 7: Potentialverlauf und Energieniveaus bei verschiedenen Feldstärken aus (14)

Brücken mit ihrer Umgebung. Alle diese Einflüsse bewirken eine Unsymmetrie des Potentials. In Abb. 7 ist das Potential in Abhängigkeit von der elektrischen Feldstärke für einen O-O-Abstand von $2,6 \text{ \AA}$ aufgetragen. Man sieht, daß mit zunehmender Feldstärke das Potential unsymmetrischer wird, so daß an Stelle des Potentialwalls ein Wendepunkt tritt.

Unsymmetrisches Potential

Es sind aber nun keineswegs nur Brücken, die im isolierten Zustand symmetrisch sind, leicht polarisierbar. Vielmehr können auch unsymmetrische Wasserstoff-Brücken noch beträchtlich polarisierbar sein. In Abb. 8 ist die

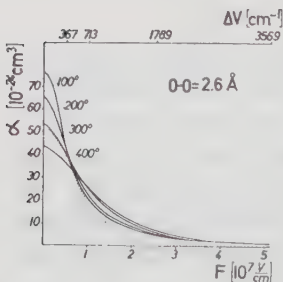


Abb. 8: Abhängigkeit der Polarisierbarkeit von der Feldstärke und dem Energieabstand der beiden Minima aus (14)

Polarisierbarkeit α in Abhängigkeit von der elektrischen Feldstärke F und dem Energieabstand ΔV der beiden Minima für einen O-O-Abstand von $2,6 \text{ \AA}$ aufgetragen. Daraus geht hervor, daß selbst bei einem ΔV -Wert von 1000 cm^{-1} die Polarisierbarkeit um eine Größenordnung über der von Elektronensystemen liegt.

Solche Brücken können z. B. zwischen Säure-OH-Gruppen und Wasser auftreten (s. Kap. 3.2 und 3.3) und spielen in wäßrigen Lösungen von ATP und ADP eine Rolle (Kap. 4).

3.2 Ergebnisse der Untersuchungen an ortho-Phosphat und -Phosphorsäure

In diesem Kapitel soll auf die Ergebnisse der Untersuchungen von Schiöberg (16) (45) an wäßrigen Lösungen von ortho-Phosphat und -Phosphorsäure eingegangen werden. Sie sind aus zwei Gründen von besonderer Wichtigkeit für die vorliegenden Messungen:

- 1) Die Phosphatkette von ADP und ATP ist aus zwei bzw. drei PO_3 -Gruppen aufgebaut, die durch Anhydridbindungen miteinander verbunden sind. Die Sauerstoffatome sind kräftige Protonenakzeptoren. Es lassen sich also ähnliche Eigenschaften bezüglich der Ausbildung von Wasserstoff-Brücken erwarten wie beim ortho-Phosphat.
- 2) Bei der Hydrolyse von ATP entsteht ortho-Phosphat. Für eine Analyse der dabei auftretenden zwischenmolekularen Wechselwirkungen ist eine genaue Kenntnis der Verhältnisse beim ortho-Phosphat notwendig.

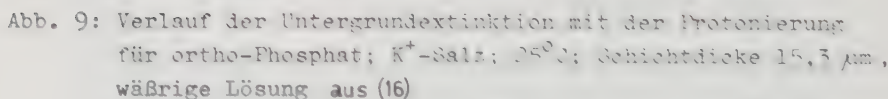
In Abb. 9 ist in Abhängigkeit von der Protonierung die Kontinuumsabsorption aufgetragen. Daraus kann man folgendes entnehmen:

- a) Es bilden sich leicht polarisierbare Wasserstoff-Brücken zwischen den O-Atomen der Phosphate bei 50% und 150% Protonierung. Es handelt sich dabei um geladene Wasserstoff-Brücken, die durch die beiden Grenzstrukturen



beschrieben werden können. Da Akzeptor und Donor den gleichen pK_a haben, liegt eine Wasserstoff-Brücke mit im zeitlichen Mittel symmetrischem Potential vor. Die leicht polarisierbare Wasserstoff-Brücke bei 150% ist von besonderem Interesse, da sie gerade im physiologischen pH-Bereich auftritt ($\text{pK}_a = 7,2$) (48)⁺).

⁺) pK_a -Werte in diesem Kapitel jeweils bei 25°C und einer Ionenstärke $\mu = 0$.



a) in Abhängigkeit von der Protonierung für zwei verschiedene Konzentrationen

b) - c) in Abhängigkeit von der Konzentration (%)

b) + 0%; ▲ 50%; • 100% Protonierung

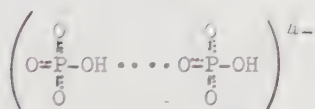
c) + 100%; • 150%; ▲ 200% Protonierung

d) ▲ 200%; ● 250%; + 300% Protonierung

e) Vergleich von HCl mit H_3PO_4

b) Bei 0% und bei 300% Protonierung treten leicht polarisierbare Wasserstoff-Brücken aus Hydratwasser auf, wobei bei 0% das Phosphat als Akzeptor und bei 300% als Donor wirkt. Die Ergebnisse für die Phosphorsäure ($\approx$ 300% Protonierung) sind besonders interessant, da ADP und ATP einen zw. zwei pK_s -Werte in derselben Größenordnung (2,1) wie $H_2PO_4^-$ (2,1) haben. In der Brücke $POH \cdots OH_2$ befindet sich das Proton ganz auf der Seite der Phosphorsäure. Trotz dieser Asymmetrie wird ein kräftiges Kontinuum beobachtet (Abb. 9).

c) Bei 100% Protonierung werden Wasserstoff-Brücken zwischen den Hydrogenphosphaten geknüpft. Diese sind jedoch zu unsymmetrisch, um leicht polarisierbar zu sein. Es handelt sich also um geladene Brücken der Art



Sie zeigen keine Kontinuumsabsorption, sondern sind an folgenden Banden zu erkennen:

- $\sim 1250 \text{ cm}^{-1}$ ($\delta(OH)$) in $(POH \cdots ^-OP)$ -Brücke (D-Bande)
- $\sim 1900 \text{ cm}^{-1}$ ($2\gamma(OH)$) in $(POH \cdots ^-OP)$ -Brücke (C-Bande)
- $\sim 2400 \text{ cm}^{-1}$ ($2\delta(OH)$) in $(POH \cdots ^-OP)$ -Brücke (E-Bande)

Sie werden von Hadži (49) (50) den Oberschwingungen der in-plane- (δ) und out-of-plane-Deformationsschwingung (γ) der POH -Gruppe in der Wasserstoff-Brücke zugeschrieben, die durch FERMI-Resonanz mit der Valenzschwingung $\nu(OH)$ in der Wasserstoff-Brücke bei 2900 cm^{-1} (A-Bande) verstärkt werden. Der Übergang von Kontinuumsabsorption zur Bandenbildung ist seiner Natur nach fließend.

3.3 ΔpK_a , Symmetrie des Potentials und IR-Kontinuumsabsorption

Einen Anhaltspunkt für die Diskussion, welche Wasserstoff-Brücken leicht polarisierbar sind, gibt der ΔpK_a . Er ist definiert als die Differenz zwischen den Protonenakzeptorstärken von Donor A und Akzeptor B in der Wasserstoff-Brücke $AH \cdots B$:

$$\Delta pK_a = pK_a (A) - pK_a (B).$$

So ist der $\Delta pK_a = 0$ für die leicht polarisierbaren Brücken bei 50% und 150% Protonierung (s. Punkt a), während er für die Brücken bei 100% Protonierung $7,2 - 2,1 = 5,1$ beträgt (s. Punkt c). Wasser hat zwei pK_a -Werte, einen für die Aufnahme eines Protons (-1,8) und einen für die Abgabe (15,4). Bei 300% bilden sich also Brücken, deren $\Delta pK_a = 2,1 - (-1,8) = 3,9$ beträgt, während bei 0% Protonierung der $\Delta pK_a = 15,4 - 12,1 = 3,3$ ist. Die pK_a -Werte von ATP und ADP liegen zwischen 7 und 1. Für die Diskussion der Wechselwirkungen von ADP und ATP mit ihrer Umgebung sind also besonders Donoren und Akzeptoren in diesem pK_a -Bereich interessant. Schiöberg (45) hat Säuren in wässriger Lösung im pK_a -Bereich von -11 bis +5 untersucht und den in Abb. 10 dargestellten Zusammenhang zwischen pK_a und Kontinuumsabsorption gefunden. Unterhalb einem pK_a von -2 bleibt die Kontinuumsabsorption konstant, was auf die Ausbildung von $H_5O_2^+$ -Brücken zurückzuführen ist. Diese Brücken zeigen die stärkste Anhebung des Kontinuums. Zu größeren pK_a -Werten hin tragen insbesondere auch Wasserstoff-Brücken zwischen den Säure-OH-Gruppen und den Wassermolekülen ebenso wie bisweilen, z. B. beim Phosphat (s. Punkt a, b), Wasserstoff-Brücken zwischen den Säure-Molekülen zum Kontinuum bei. Mit zunehmendem pK_a wird das Potential in diesen Brücken immer unsymmetrischer, so daß ab einem ΔpK_a von 4 an Stelle der Kontinuumsabsorption Banden zu beobachten sind (s. Punkt c). Diese Banden treten in allen Systemen mit starken Wasserstoff-Brücken auf (50).

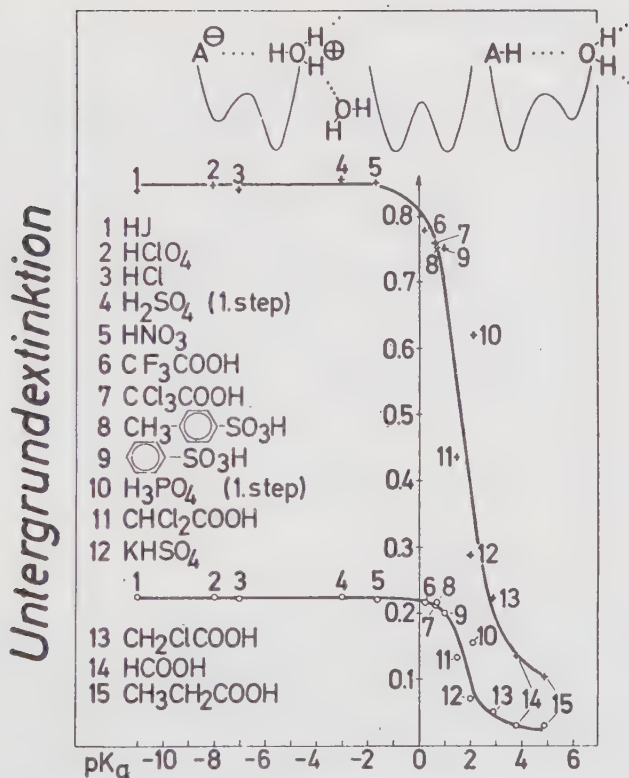


Abb. 10: IR-Kontinuumsabsorption von Spektren wäßriger Säurelösungen in Abhängigkeit vom pK_a der Säuren (Schichtdicke $15,3 \mu$; $25^\circ C$) aus (16)

+++++ 5 M Lösungen

o-o-o-o 1 M Lösungen

4. Messungen und Resultate

4.1 Stand der Forschung

Phillips (52) hat 1966 eine umfassende Übersicht über alle bis dahin durchgeführten Untersuchungen der Adeninphosphate gegeben. Sie wurde 1971 von Izatt et al. (53) um die neueren Ergebnisse erweitert. Die meisten Untersuchungen galten der Bestimmung der Dissoziationskonstanten für Protonen (pK_a) und der Bindungskonstanten für Metallionen. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf den Einfluß zweiwertiger Kationen, namentlich Mg^{2+} und Ca^{2+} gelegt, da diese in biologischen Systemen in der Regel an ATP gebunden sind. Fast alle gängigen physikalischen und chemischen Methoden wurden von zahlreichen Autoren bisher schon angewandt. Dem gegenüber ist dem eigentlichen Hydrolysevorgang und seinen molekularen Mechanismen nur relativ wenig Aufmerksamkeit gewidmet worden.

Unter Standardbedingungen und bei $pH = 7,00$ werden bei der Reaktion



-7,93 kcal/mol (1) frei. Einfache organische Esterbindungen (z.B. im AMP, Äthyl-acetat, Glucose-6-Phosphat) liefern bei der Hydrolyse nur ca. 3 kcal/mol. Verbindungen, bei deren hydrolytischer Spaltung mehr als diese Fundamental-Enthalpie frei werden (bis ca. 13 kcal/mol) (54), werden als "energiereich" bezeichnet. Dieser Begriff der energiereichen Bindung ist insofern irreführend, als es sich hierbei nicht um Bindungsenthalpien handelt, deren Werte um Größenordnungen über den obengenannten liegen, sondern um die freie Enthalpie der Hydrolyse, die in biologischen Systemen optimal verfügbar wird.

Bisher ist es nicht gelungen, eine einheitliche Theorie für die molekularen Ursachen der energiereichen Bindung aufzustellen. Zuerst von Kalckar (55) vorgeschlagen, dann von Oesper (4) berechnet und neuerdings wieder von Pauling (5) begründet, ist die Theorie der "opposing resonance". Sie sagt aus, daß die Ausgangssubstanzen weniger stark mesomeriestabilisiert sind als die Endprodukte, und vermag damit z. B. beim ATP einen Teil der freigesetzten Enthalpie zu erklären.

Von Hill und Morales (2) wurde die "elektrostatische Abstoßung" der negativ geladenen Gruppen für einen wesentlichen Teil des energiereichen Charakters verantwortlich gemacht. Diese spielt aber nicht bei allen energiereichen Substanzen eine Rolle.

George et al. (6) weisen mit Nachdruck darauf hin, daß bei allen Berechnungen der Einfluß des umgebenden Lösungsmittels, also Wasser bei biologischen Vorgängen, nicht berücksichtigt wurde. Berechnungen der Hydratationsenthalpien zeigen, daß die Unterschiede zwischen pyro- oder tripolyphosphat und den jeweiligen Zerfallsprodukten durchaus in der Größenordnung einiger kcal/mol liegen. Die exakte Schreibweise muß also lauten:



Schon in einer früheren Arbeit (54) hatten George und Rutman eine thermodynamische Analyse der Hydrolyse energiereicher Phosphate vorgenommen. Sie betonen darin, daß alle pK_a -Werte wichtig für das Hydrolysegleichgewicht sind. Darüber hinaus werden auch die Wasserstoff-Brücken-Donor- und Akzeptoreigenschaften im jeweiligen pH-Bereich durch den Protonierungszustand der energiereichen Phosphate bestimmt, wie in Kap. 3 gezeigt wurde. Thermodynamische Größen gestatten nur bedingt Aussagen über molekulare Mechanismen. Die IR-Spektroskopie ermöglicht es nun, detaillierten Aufschluß über Vorgänge auf molekularer Ebene zu erhalten. Angewandt auf die Untersuchung des Hydrolysevorganges bedeutet das, daß man Aussagen zu folgenden Fragestellungen machen kann:

- 1) den Ort der Bindung von Protonen
- 2) die Ausbildung von Wasserstoff-Brücken, besonders von leicht polarisierbaren, zwischen den Molekülen bzw. den Molekülen und der Hydrathülle
- 3) den Einfluß zweiwertiger Kationen (hier Mg^{2+}).

Von Hofmann (17) (18) wurden bereits Untersuchungen an Adenosinphosphaten und hydrolysierendem Mg^{2+} -Komplex des ATP durchgeführt. Es zeigte sich allerdings im Laufe meiner Messungen (s. Kap. 2.1 und 2.5), daß bei Hofmann einige wichtige Voraussetzungen (Reinheit der Ausgangssubstanzen, Reproduzierbarkeit der Küvetten-Schichtdicke) nicht erfüllt waren, so daß teilweise fehlerhafte Ergebnisse interpretiert wurden. Da die untersuchten Systeme auf Änderungen der Protonenkonzentration empfindlich ansprechen und die beobachteten quantitativen Änderungen der IR-Extinktion relativ gering sind, wurde auf die obengenannten Voraussetzungen in den vorliegenden Messungen größter Wert gelegt. Im folgenden wird jeweils an der entsprechenden Stelle kritisch auf die Messungen und Ergebnisse von Hofmann eingegangen werden.

4.2 Protonierung von ATP und ADP und den Mg^{2+} -Komplexen

4.2.1 pK_a -Werte und pH-Abhängigkeit der Protonierung

Im folgenden Kapitel werden die Ausgangs- und Endprodukte, die bei der Hydrolyse von ATP und MgATP auftreten, schrittweise protoniert (s. Kap. 2.7) und IR-spektroskopisch untersucht. Die Tabelle 1 zeigt eine Aufstellung der pK_a -Werte von ATP und ADP mit und ohne Mg^{2+} . Daraus läßt sich ein Überblick gewinnen, in welcher Reihenfolge die Akzeptoren protoniert werden.

Bei der Angabe von exakten pK_a -Werten ergibt sich allerdings eine Schwierigkeit: Wie schon aus den zusammenfassenden Arbeiten von Phillips (52) und Izatt et al. (53) hervorgeht, existiert eine große Anzahl von Messungen der pK_a -Werte von Adenin-Nukleotiden und deren Metallionen-Komplexen. Die Werte differieren teilweise stark. Es gibt dafür mehrere Gründe: 1) unterschiedliche Methoden (s. (52)), 2) unterschiedliche Ionenstärken, 3) verschiedene Elektrolytlösungen (KCl- und NaCl sind ungeeignet, da K^+ und Na^+ mit den Phosphatgruppen wechselwirken.).

pK_a	Akzeptor	Methode	μ	ATP	ADP	MgATP	MgADP	Literatur
	Ribose (2'-OH u. 3'-OH)	pH- Titration	0,0	12,35	12,35	-	-	(56)
1.	γ -Phos- phat (oder β)	"	0,0	7,68	7,20	5,44	5,38	(57) - (59)
		"	0,1	6,53	6,44	-	-	(88) (89)
		"	0,2	6,95	6,88	5,0	5,1	(60) (61)
		Raman		6,50	-	4,43	-	(67) - (68)
		IR		6,7	-	4,5	-	(70)
2.	Adenin (N_1)	pH- Titration	0,1	4,05	3,99	3,75	3,87	(63)
		"	0,1	4,06	3,95	-	-	(88) (89)
		"	0,1	4,26	4,21	4,12	4,16	(62)
		Raman		4,15	-	3,68	-	(67) - (68)
		IR		4,05	-	3,80	-	(70)
3.	γ -Phos- phat (oder β)			2,0	2,0			(6)
				1,3				(63a)
4.	β -Phos- phat (oder α)			1,0	1,0			(6)
5.	α -Phos- phat			1,0	-		-	(6)

Tabelle 1: pK_a -Werte von ATP, ADP und den Mg^{2+} -Komplexen bei 25°C

Spektroskopische Methoden zur Bestimmung der pK_a -Werte sind bisher nur wenig eingesetzt worden (67) - (68), (70). Sie liefern die genauesten Werte, da jeweils nur der Akzeptor betrachtet wird, der gerade protoniert wird. Spektroskopisch wird also der wahre Dissoziationsgrad α'_w gemessen im Gegensatz zum elektrochemisch gemessenen Dissoziationsgrad α' . (Siehe dazu auch (11), (45)). Für die vorliegenden Messungen wurden deshalb die spektroskopisch ermittelten pK_a -Werte herangezogen, soweit sie bestimmt wurden, sonst die übrigen in Tabelle 1 aufgestellten Werte aus der Literatur.

In dem von uns untersuchten Bereich ist der Akzeptor mit dem pK_a 12,3 bereits protoniert. Die zu betrachtenden pK_a -Werte liegen also zwischen 7,0 und 1,0. Am interessantesten ist die Protonierung am endständigen Phosphat ($\approx 6,5$) und an der Base ($\approx 4,0$), da sie im oder nahe beim physiologischen pH-Bereich liegen. Man sieht an Hand der Tabelle, daß im 1. Schritt in allen Fällen das endständige Phosphat protoniert wird. Da beim ATP und ADP der nächste pK_a ungefähr 2,5 tiefer liegt, wird der Basenrest nach dem Phosphat protoniert. Nach übereinstimmender Ansicht der meisten Autoren (52) (53) erfolgt die Protonierung am N_1 -Stickstoff. Durch die Wechselwirkung des Mg^{2+} mit der Phosphatgruppe wird der 1. pK_a soweit abgesenkt, daß die 2. Protonierung beim MgATP und MgADP schon lange, bevor die erste abgeschlossen ist, erfolgt. Die Art der Wechselwirkung von Mg^{2+} mit ATP und ADP wird im Kapitel 4.2.7 behandelt.

Die pK_a -Werte im Bereich 2,0 bis 1,0 liegen sehr dicht beieinander. Die angegebenen Werte sind allerdings recht ungenau, da nur sehr wenige Messungen existieren (52) (5). Sie können deshalb nur als grober Anhaltspunkt dienen. Obwohl von George und Rutman (6) bereits 1960 auf die Wichtigkeit der exakten Bestimmung aller pK_a für das Hydrolysegleichgewicht hingewiesen wurde, sind seither wenig Anstrengungen in dieser Richtung unternommen worden.

In Abb. 11 ist die Abhängigkeit des pH von der Protonierung für ATP und MgATP in jeweils zwei verschiedenen Konzentrationen bei $10^\circ C$ aufgetragen. Daraus kann man folgendes entnehmen:

- 1) Durch die Komplexbildung mit Mg^{2+} wird die Kurve deutlich nach kleineren pH-Werten verschoben.
- 2) Beim unprotonierten ATP und MgATP liegt der pH im basischen.
- 3) Im physiologischen pH-Bereich ist ATP zu etwa 25% protoniert ⁺), MgATP wesentlich schwächer. Die Komplexbildung

⁺) In den IR-Untersuchungen von Epp et al. (64) wurde bei pH=7,0 vollständige Protonierung angenommen. Die Zuordnung der Banden durch diese Autoren ist deshalb, soweit sich die Banden mit der Protonierung ändern, falsch.

mit Mg^{2+} hat also den Effekt, daß im physiologischen pH-Bereich fast alle Protonen abdissoziiert sind.

- 4) Auch bei den höheren Protonierungsstufen erfolgt, bei gleichem pH, eine Deprotonierung durch die Mg^{2+} -Komplexbildung (s. auch Kap. 4.2.8). Es muß also noch eine Wechselwirkung des Mg^{2+} mit der protonierten Phosphatkette bestehen.

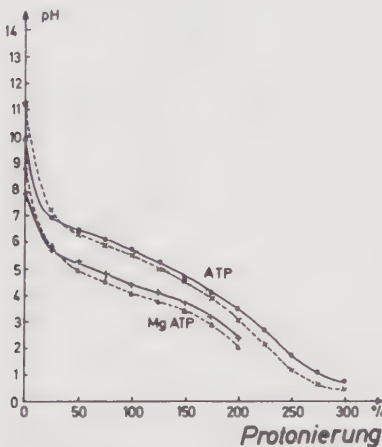


Abb. 11: Abhängigkeit des pH von der Protonierung für ATP und MgATP bei 10°C

o-o-o- ATP 1,45 M, x-x-x- ATP 0,25 M

+--+ MgATP 0,85 M, ▲-▲-▲- MgATP 0,25 M

4.2.2 Ladungsverteilung im ATP- und ADP-Molekül und Konformation

In Abb. 12 ist das ATP- und ADP-Molekül dargestellt.

Ladungsverteilung

Das vollständig dissoziierte ATP-Molekül ist insgesamt 4-fach negativ geladen (ADP 3-fach), ist also eine 4-wertige (3-wertige) Säure. In der 1. Protonierungsstufe wird eine negative Gruppe

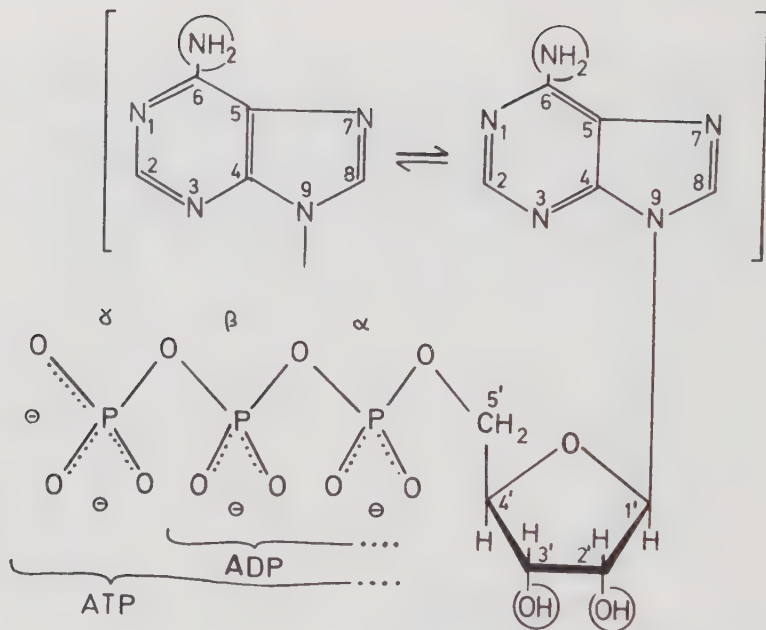


Abb. 12: Das ADP- und das ATP-Molekül

am endständigen Phosphat neutralisiert, in der 2. Stufe der N_1 -Stickstoff des Basenrestes protoniert. Dadurch wird das Molekül zum "Zwitterion" (47) mit einer positiven Ladung am Adeninring und zwei negativen Ladungen an der Phosphatgruppe. Bei weiterer Protonierung werden diese negativen Ladungen neutralisiert.

pK_a , Wasserstoff-Brücken-Donor- und Akzeptor-Eigenschaften

Die O-Atome und N-Atome sind Wasserstoff-Brücken-Akzeptoren und die OH- und NH-Gruppen (in Abb. 12 eingekreist) Wasserstoff-Brücken-Donoren. Zusätzlich zu den vier Akzeptoren, für die der pK_a -Wert bestimmt wurde, gibt es 31 freie Elektronenpaare (beim ADP 25), die ebenfalls Akzeptoren für Wasserstoff-Brücken sein können. Beim vollständig dissoziierten ATP und ADP gibt es vier Wasserstoff-Atome als Donoren für Wasserstoff-Brücken. Mit der Protonierung verwandeln sich

Wasserstoff-Brücken-Akzeptoren in -Donoren. Bei einem bestimmten pH-Wert sind diejenigen Gruppen die stärksten Wasserstoff-Brücken-Akzeptoren, deren pK_a -Werte nur wenig unter diesem pH-Wert liegen, und die stärksten Wasserstoff-Brücken-Donoren, diejenigen, deren pK_a -Werte nur wenig über diesem pH-Wert liegen. Im physiologischen pH-Bereich ist deshalb die Gruppe mit dem pK_a von 6,5 ein besonders starker Wasserstoff-Brücken-Akzeptor. Im zunehmend sauren Milieu wird diese Gruppe protoniert und wirkt dann als starker Wasserstoff-Brücken-Donor. Die Gruppen mit den niedrigen pK_a -Werten (4,1 - 1) sind keine so starken Wasserstoff-Brücken-Akzeptoren. In Kap. 4.2.4 werden die Eigenschaften und das Auftreten leicht polarisierbarer Wasserstoff-Brücken eingehend diskutiert.

Konformation

Durch die verschiedenen Ladungszustände nimmt das Molekül auch verschiedene Konformationen ein. (Zur Konformation von Nukleosiden und Nukleotiden siehe (86) (97)). Das Molekül hat mehrere innere Achsen, um die Gruppen drehbar sind: C_1 , - N_9 , C_4 , - C_5 , und in der Phosphatkette die C_5 -O-Bindung und die P-O-P-Bindungen. Durch die Drehung um die Verbindungsachse zwischen Adeninring und Ribose werden die Wasserstoff-Brücken-Akzeptoren und -Donoren mehr oder weniger stark zur Phosphatkette hin orientiert. Durch Drehungen um die Bindungen in der Phosphatkette nimmt diese eine mehr gestreckte oder gewinkelte Form ein. Diese Überlegungen zur Konformation sind aus zwei Gründen von Interesse:

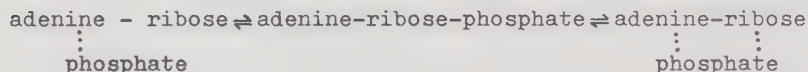
- 1) Sind innermolekulare Wasserstoff-Brücken zwischen Adeninring und Phosphatkette und Ribose möglich?
- 2) Bewirken diese eine "gefaltete" Struktur des Moleküls?

Phillips (52) schreibt dazu:

"It seems that the following types of intramolecular interaction are sterically and energetically possible in ADP and ATP: 1. H bond formation between negative oxygens of the phosphate chains and the C-2' and C-3' hydroxyls of the ribose moiety (several combinations). 2. H bond formation between negative oxygens of the terminal group of the phosphate chain and the hydrogens of the ring NH_2 group. 3. H bond formation between the secondary phosphate hydrogen of the terminal phos-

phate group and the nitrogen of the ring NH_2 group. 4. Electrostatic interaction between the positively charged, protonated ring and the negative phosphate chain, with as yet unassessed conformational effects.

It must be admitted then that the general structure of ATP and ADP in solution is described by the following equilibrium



where the dotted lines represent hydrogen bonds or electrostatic interaction. Working against the ordering tendency of hydrogen bond formation and electrostatic interactions would be the disruptive effects of hydration and thermal motion (which would be a sizeable factor for such large structural units as adenine, ribose, and the phosphate chain). However, at present it is difficult to say where the balance lies....."

Kennard et al. (65) (66) untersuchten $\text{Na}_2\text{H}_2\text{ATP} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ -Einkristalle (also das Zwitterion) mit Hilfe von Röntgenbeugung. Sie konnten folgendes nachweisen:

- a) Es existieren zwei Konformationen der Ribose (A und B), die sich durch die Anordnung der C_2 - und C_3 -Atome unterscheiden (A: out-of-plane-Atom C_2 , endo, B: C_3 , endo).
- b) Die Phosphatkette ist zur Purinbase hin orientiert.
- c) Die Basenreste der Molekülformen A und B sind abwechselnd übereinander angeordnet ("stacking") im Abstand von 3,5 Å.
- d) Es treten Wasserstoff-Brücken auf zwischen dem Adeninring und den Phosphat-O-Atomen (intermolekular).
- e) Intramolekulare Wasserstoff-Brücken wurden nicht nachgewiesen.

Beim zweifach protonierten ATP treten also in Kristallen zwischenmolekulare H-Brücken auf. Die $(\text{NH}^+ \cdots \text{O}^-)$ -Brücken (Punkt d) stabilisieren das "stacking" der Basen (98) (101). Die daraus abgeleitete Struktur des zweifach geladenen ATP-Moleküls kann nicht ohne weiteres auf andere Ladungszustände übertragen werden. Außerdem spielt die Hydratation gerade bei den Adenin-Nukleotiden eine wesentliche Rolle (6), so daß die zwischenmolekularen Wechselwirkungen ("stacking",

Wasserstoff-Brücken-Bindung) in Lösungen durchaus verschieden sein können. Die vorliegenden Messungen wurden an recht hochkonzentrierten Lösungen gemacht; die bisher daran gewonnenen Ergebnisse für Nukleoside und Nukleotide (86) stimmen gut mit denen von Kristallen überein (97) (98), so daß sie zur Interpretation mitherangezogen werden können.

4.2.3 IR-Spektren von ATP

Die Abb. 13, 14 und 15 zeigen die IR-Spektren von 0,25 M und 1,45 M wäßrigen Lösungen von ATP. Als Parameter wurde die Protonierung geändert (100% entspricht 1 Mol H^+ pro Mol ATP). Die restlichen Ladungen wurden durch K^+ abgesättigt. Im Protonierungsbereich 300 - 400% beträgt die Konzentration wegen der verminderten Löslichkeit des H_4ATP nur 1,0 M. In den Spektren mit der niedrigen Konzentration (Abb. 15) ist die Ordinate zweifach gedehnt, um quantitative Änderungen der Extinktion besser erfassen zu können. Im Bereich $3600 - 3000\text{ cm}^{-1}$ absorbieren bei den Proben mit der kleineren Konzentration die OH-Valenzschwingungen des H_2O sehr stark. Da man diesem Bereich deshalb bei der verwendeten Schichtdicke keine Information entnehmen kann, wurde er nicht registriert.

Von Khalil und Brown (70), Brintzinger (71) - (73) und Hofmann (17) wurden IR-Spektren von ATP und ADP in wäßriger Lösung aufgenommen, allerdings nicht über den gesamten Spektralbereich und nur bei einzelnen Protonierungsstufen. Die

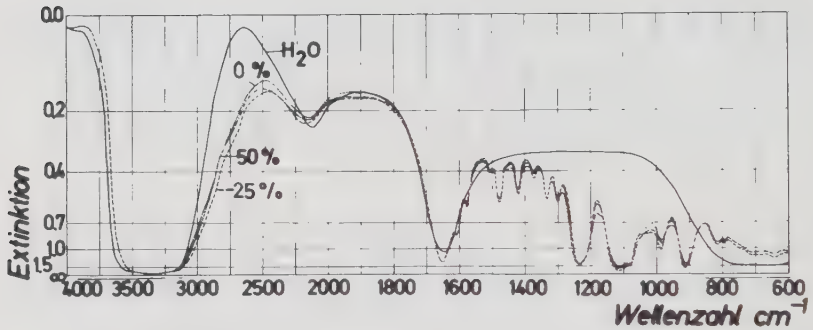


Abb. 13: IR-Spektren von wässrigen $K_{4+m}(OH)_m$ ATP-Lösungen
 $m=0,25; 1,45$ M; 10°C ; Ge-Küvette ($15,3 \mu\text{m}$ Schichtdicke)

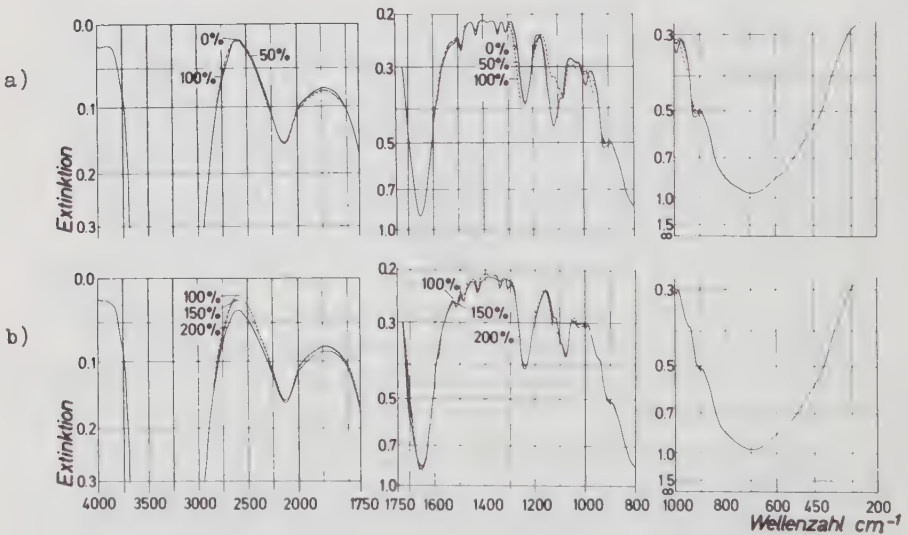


Abb.14 : IR-Spektren von wässrigen H_nK_{4-n} ATP-Lösungen ($0 \leq n \leq 2$)
 $0,25$ M; 10°C ; Si-Küvette ($12,1 \mu\text{m}$ Schichtdicke);
 Ordinate zweifach gedehnt

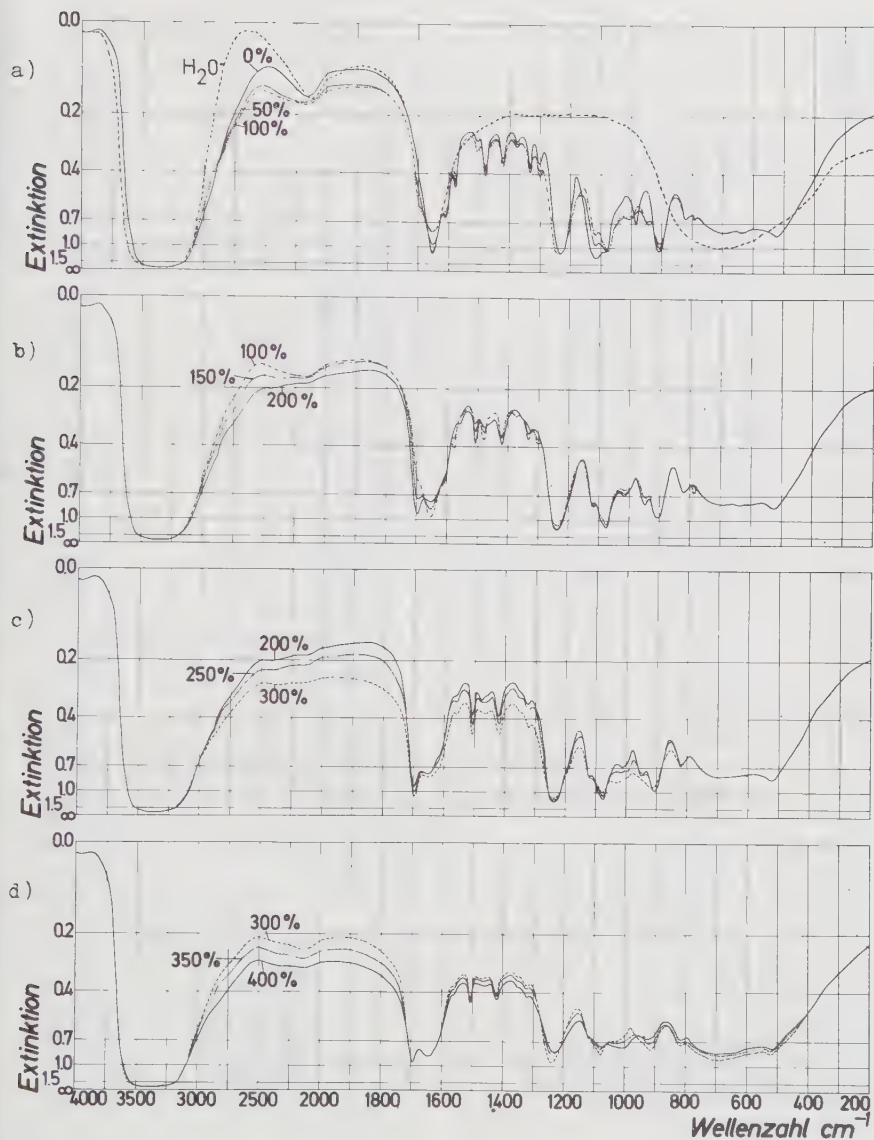


Abb.15 : IR-Spektren von wäßrigen H_nK_{4-n} ATP-Lösungen ($0 \leq n \leq 4$)
 10°C; Si-Küvette (12,1 μ m Schichtdicke)
 0 % bis 300% Protonierung: 1,45 M
 300% bis 400% Protonierung: 1,0 M

Protonierung	ATP	ADP	MgATP	MgADP	Zuordnung	Lit.				
0%	3600- 3100	s	3600- 3100	s	3600- 3100	s	ν OH des H_2O	(74)		
	3100	s	3100	s	3100		ν OH in $PO_4^{3-} \cdots OH_2$	(51)(77)		
	2940	sh	2950	sh	2950	sh	$\nu_{as} CH_2, \nu CH$	(10)(76)		
	2130	m, br	2140	m, br	2130	m, br	H_2O -Scheren- + Torsionsschw.	(74)		
	1655	vs	1655	vs	1651	vs	1650	s	Valenz C=N und C=C gekoppelt mit δNH_2	(69)(75)
	1610	sh	1611	sh	1605	sh	1600	sh	δNH_2	(69)(75)
	1578	s	1582	s	1575	s	1580	s	$\nu C=N, \nu C=C$	(76)
	1509	w	1510	w	1505	w	1510	w	δCH_2	(76)
	1480	m	1482	m	1481	m	1480	m	Basenringschwin- gungen	(76)(83)
	1422	m	1422	m	1422	m	1420	m		(76)(83)
	1378	m	1380	m	1375	m	1375	m		(76)(83)
	1335	m	1337	m	1335	m	1337	m		(76)(83)
	1304	m	1305	m	1302	m	1300	m	$\nu C-NH_2$	(76)(83)
	-		1250	sh	-		1245	sh	$\nu_{as} PO_2^-(OH)$	(83)
	1235	s	1215	s	1243	s	1214	s	$\nu_{as} PO_2^-$	(51)(79)
	1138	sh	1135	sh	-		-		$\nu P-O-C$	(76)
	1118	s	1112	s	1125	s	1118	s	$\nu_{as} PO_3^{2-}, \nu \left(\begin{smallmatrix} C-C-C \\ \\ O \end{smallmatrix} \right)$ Ribose	(51)(79) (69)
	1085	sh	-		1090	sh	-		$\nu_s PO_2^-$	(69)
	1040	sh	1050	sh	1040	sh	1050	sh	$\nu C-O-(P)$ $\nu C-O$	(76)(69) (10)
	988	m	1015	m	988	m	1012	m	$\nu_s PO_3^{2-}$	(51)(71) (69)(79)
	915	s	936	s	915	s	935	s	$\nu_{as} P-O-P$	(79)
	820	m	820	m	815	m	820	m	γCH	(10)(83)
	790	w	795	w	790	w	795	w		
	710	s, br	710	s, br	710	s, br	710	s, br	H_2O -Torsionsschwin- gung $\nu_s P-O-P$	(74)
	640	sh	645	w	635	sh	-		Basenring-Def.	(83)
	530	sh	530	sh	550	sh	530	sh	$\delta PO_2^- (?)$	(79)(80)
	475	sh	-		-		-		$\delta O-P-O, \delta PO_2^- (?)$	(78)
	390	sh	-		-		-		$\delta P-O-P (?)$	(78)

Tabelle 2: Bandenlagen und Zuordnung für ATP, ADP und die Mg^{2+} -Komplex
in wässriger Lösung

Protein- name	ADP		ADP		ATP		ADP		Zuordnung	Lit.
2000 (nur anden, die sich regen- über 0% ge- ändert haben)	2000 sh	2000 sh	2380 w, br	2380 w, br	2000 sh	2000 sh	2000 sh	2000 sh	ν OH in POH...OH ₂ 2 δ PO-H	(49)(50) (49)(50)
	1695 sh	1695 sh	1648 s	1643 s	1690 sh	1695 sh	1695 sh	1695 sh	ν C=NH ⁺ u. ν C=CH ⁺ H ₂ O-Scherenschwg.	(69)(75) (74)
	1240 s	1224 s	1240 s	1220 s	1240 s	1220 s	1220 s	1220 s	ν_{as} PO ₂ ⁻ , δ PO-H	(51)(79)
	1120 m	1110 m	1122 m	1110 m	1122 m	1110 m	1110 m	1110 m	ν_{C-O} Ribose, ν_s PO ₂ ⁻ (OH)	(69)(78)
	1095 sh	-	1095 sh	-	1095 sh	-	-	-	ν_s PO ₂ ⁻	(69)
	1075 s	1080 s	1080 s	1080 s	1080 s	1080 s	1080 s	1080 s		
	1020 w	1040 sh	1000 w	1040 sh	1000 w	1040 sh	1040 sh	1040 sh	ν P-(OH) (?)	(94)
	945 m	975 m	945 m	975 m	945 m	975 m	975 m	975 m	ν P-OH; ν P-O-P (?)	(10)(78)
	905 s	925 s	905 s	930 s	905 s	930 s	930 s	930 s	ν_{as} P-O-P	(78)
	875 w, br	890 w	870 w	890 w	870 w	890 w	890 w	890 w	γ PO-H	(49)(50)
200% (s.o.)	2700 2380 w, br	2700 2400 w, br	2700 2380 w, br	2700 2400 w, br	2700 2380 w, br	2700 2400 w, br	2700 2400 w, br	2700 2400 w, br	ν (C=N)H ⁺	(76)(82)
	1555 sh	1560 sh	1555 sh	1555 sh	1555 sh	1550 sh	1550 sh	1550 sh	Basenring- schwingungen	(76)
	1460 w, br	1460 w, br	1460 w, br	1460 w, br	1460 w, br	1460 w, br	1460 w, br	1460 w, br		(76)
	1350 vw	1355 vw	1355 vw	1355 vw	1355 vw	1352 vw	1352 vw	1352 vw		(76)
	1322 w	1320 w	1320 w	1320 w	1320 w	1320 w	1320 w	1320 w		
	1240 s	1225 s	1240 s	1225 s	1240 s	1225 s	1225 s	1225 s	ν_{as} PO ₂ ⁻	(51)(79)
	1090 sh	1080 s	1100 sh	1080 s	1100 sh	1080 s	1080 s	1080 s	ν_s PO ₂ ⁻	(51)(79)
	1072 s	1080 s	1080 s	1080 s	1080 s	1080 s	1080 s	1080 s		
300% und 400% (s.o.)	1610 sh	1610 sh	-	-	-	-	-	-	(?)	
	1230 s	1225 s	-	-	-	-	-	-	ν_{as} PO ₂ ⁻ , ν P=O, δ PO-H	(51)(79) (93)(50)
	1050 m, br	1050 m, br	-	-	-	-	-	-	ν P-OH (?)	(94)
	950 m, br	950 m, br	-	-	-	-	-	-	ν_{as} P-(OH) ₂	(79)(77)

Noch Tab.2

Konzentrationen lagen meist bei 0,1 M, bei Hofmann bei 60 $\text{H}_2\text{O}/\text{ATP}$. Hofmann untersuchte auch hydratisierte Filme bei 7% Luftfeuchtigkeit.

4.2.3.1 Bandenzuordnung

Die Zuordnung der Banden ist (10) (51) (64) (69) (71) (76) (77) entnommen. Nicht alle Banden konnten eindeutig zugeordnet werden. Zum Teil bestehen auch Diskrepanzen zwischen den einzelnen Autoren. In Tabelle 2 sind sämtliche Bandenlagen zusammengestellt, auch für ADP und die Mg-Komplexe. Für die höheren Protonierungsstufen sind jeweils nur die neu auftretenden Banden eingetragen.

Der Bereich 4000 - 1750 cm^{-1}

In diesem Spektralbereich liegen die Valenzschwingungen der OH-, NH- und CH-Gruppen (76). Durch die breite Absorption der OH-Valenzschwingung des Wassers (74) sind diese weitgehend verdeckt. Bisweilen findet man sie als schwache Schultern an der Flanke der Wasserbande nach kleinen Wellenzahlen zu. Bei 2120 cm^{-1} liegt die Kombinationsschwingung aus der Torsions- und Scherenschwingung des Wassers (74). Außerdem treten in diesem Bereich Banden auf, die auf die Ausbildung starker Wasserstoff-Brücken schließen lassen (s. Kap. 3) (49) (50). Die Protonierung am Basenrest bewirkt ferner breite Banden bei 2700 cm^{-1} und 2380 cm^{-1} , die der $\text{C}=\text{NH}^+$ -Gruppierung zugeschrieben werden (82).

Der Bereich 1750 - 1300 cm^{-1}

In diesem Spektralbereich liegen die in-plane-Schwingungen des Adeninringes mit Valenzschwingungscharakter. Ferner findet man um 1600 cm^{-1} die NH_2 - und H_2O -Scherenschwingungen (76). Die H_2O -Scherenschwingung bei 1640 cm^{-1} (74) wird beim 0% und 100% protonierten ATP und ADP von der im folgenden diskutierten Bande bei 1655 cm^{-1} verdeckt.

Die Bande bei 1655 cm^{-1} wird einer $\text{C} = \text{C}$ und $\text{C} = \text{N}$ -Ringvalenzschwingung gekoppelt mit einer δNH_2 -Schwingung zugeschrieben (69). Sie verschwindet mit der Protonierung des Basenrests, während gleichzeitig bei 1695 cm^{-1} eine Bande auftaucht. Sie ist ebenfalls eine Ringschwingung (69). Bei 1675 cm^{-1} liegt ein isosbestischer Punkt. Zwischen den beiden Banden bei 1510 cm^{-1} und 1480 cm^{-1} liegt ebenfalls ein isosbestischer Punkt. Die erstere nimmt mit der Protonierung zu, während die zweite verschwindet. An diesen Banden ist die Protonierung am Basenrest gut zu verfolgen. Die Bande bei 1575 cm^{-1} wird der NH_2 -Scherenschwingung zugeordnet (69) (75).

Der Bereich $1300 - 800\text{ cm}^{-1}$

In diesem Spektralbereich liegen fast ausschließlich Banden der Ribose (69) und der Phosphatgruppen (69) (93) (94) sowie von Gerüstschwingungen (76). Die stark absorbierenden Phosphatgruppenschwingungen überdecken dabei meist die schwachen Ribosebanden.

Der Bereich $800 - 200\text{ cm}^{-1}$ +)

Um $710 \pm 10\text{ cm}^{-1}$ liegt das Maximum der Torsionsschwingung (= gehinderte Rotation) des H_2O (74) (85), die auf Grund von H-Brückenbindung stark verbreitert ist und sich fast über 700 cm^{-1} erstreckt. Das Maximum bei der konzentrierten ATP-Lösung ist gegenüber dem Wert für reines H_2O deutlich abgesenkt. Die übrigen Banden in diesem Spektralbereich sind out-of-plane-Deformationsschwingungen und Gerüstschwingungen zuzuordnen (76) (80). Sie werden teilweise durch die Torsions-Wasserbande verdeckt.

+) Im Bereich der starken Absorption der Siliziumfenster von $620 - 600\text{ cm}^{-1}$ liegen keine Banden des ATP und ADP, die zusätzliche Informationen liefern können (s.Kap.2.1).

Proto- nierung	ATP	-25% $\leftarrow$	0%	ADP	ATP	0%	$\rightarrow$ 100%	ADP	ATP
Banden und Zuord- nung				1655 1655 1480 1480			Ringprotonierung bleibt unverändert	1655 1655 1480 1480	
	-1040			1215 1235 ver- deckt 1085			ν_{as} ν_s	1224 1240 1080 1095 1075	
				1112 1118 1015 988		ν_{as} ν_s			
				936 915 720 720		ν_{as} ν_s		925 905 720 720	
	~ 3150	OH-Valenzschwingung in $CO_3^{2-} \cdots HOH$ -Brücke (?)		~ 3100		OH-Valenzschwingung in $PO_3^{2-} \cdots HOH$ -Brücke			
Unter- grund- extink- tion		nimmt ab $\rightarrow$ Bandenausläufer oder (OH $\cdots\cdots$ O)-Brücken				nimmt zu $\rightarrow$ (POH $\cdots\cdots$ OP)-Brücken (ATP) (OH $\cdots\cdots$ N) - . . .			

Tabelle 3: Bandenlagen und ihre Zuordnung sowie Wasserstoff-Brücken-Bindung beim ATP und ADP in wäßriger Lösung

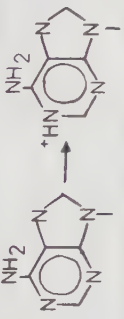
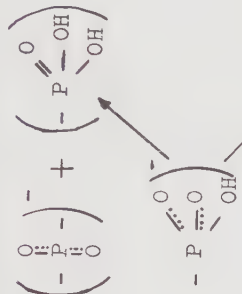
Protonierung	ADP	ATP	80% $\longrightarrow$ 200%	ADP	ATP	200% $\longrightarrow$ 300%/400%	ADP	ATP
Bandenlagen und Zuordnung	1655 1480	1655 1480		1695 1510	1695 1510	Ringprotonierung bleibt unverändert	1695 1510	1695 1510
	1224 1080 1095 1075	1240 1095 1075	bleibt unverändert	1225 1080 1090 1072	1240 1090 1072		1225 1080 1090 1072	1230 1090 1072
	925 720	905 720		925 720	905 720	P - (OH) ₂	950	945
Untergrundextinktion	2380 2700	2380 2700	ν C = NH ⁺ oder Ober- schwingung δ NH, ν NH			steigt steil an: POH...OH ₂ -Brücken POH...OP-Brücken		
			nimmt bei 1900 cm ⁻¹ linear zu (NH ⁺ ...OP) - Brücken					

Tabelle 3: Bandenlagen und ihre Zuordnung sowie Wasserstoff-Brücken-Bindung beim ATP und ADP in wässriger Lösung

4.2.4 IR-Kontinuumsabsorption von wäßrigen $H_nK_{4-n}ATP$ -Lösungen ($0 \leq n \leq 4$)

In Abb. 16 ist der Verlauf der Untergrundextinktion bei 1900 und 1400 cm^{-1} graphisch dargestellt. Der Anteil des H_2O ist, soweit er als additiv angesehen werden kann, bereits abgezogen (s. Kap. 2.10). Auf eine Wiedergabe bei 2600 cm^{-1} wurde wegen der dort auftretenden Banden (s. Kap. 3.3 und 4.2.3.1) verzichtet. Die Ausmessung der Untergrundextinktion bei 1900 cm^{-1} und 1400 cm^{-1} steht repräsentativ für die Veränderungen des Untergrundes über einen größeren Bereich. Ein gleiches Verhalten der Untergrundextinktion in diesen beiden Bereichen läßt auf die gleiche Ursache schließen, nämlich auf die Anwesenheit leicht polarisierbarer Wasserstoff-Brücken (s. Kap. 3.1). Veränderungen, die nur in relativ kleinen Spektralbereichen auftreten, sind auf Banden bzw. deren Ausläufer zurückzuführen. Diese Punkte sind bei der Auswertung der übrigen Reihen (ADP, MgATP, ATP- und MgATP-Hydrolyse) ebenfalls zu beachten und werden dort nicht nochmal erwähnt.

Im folgenden wird eine Analyse der möglichen Wasserstoff-Brücken in wäßriger Lösung von ATP mit Hilfe der Veränderungen an den Banden und der Untergrundextinktion durchgeführt. In Tab. 3 sind alle zu beobachtenden Änderungen zusammengefaßt. Zunächst werden die Ergebnisse beim unprotonierten ATP diskutiert, dann diejenigen bei den einzelnen Deprotonierungs- und Protonierungsstufen und jeweils mit den vorhergehenden Ergebnissen verglichen.

4.2.4.1 0% Protonierung (Abb. 14a, 15a)

Beim unprotonierten ATP liegt die antisymmetrische Valenzschwingung der PO_2^- -Gruppe bei 1235 cm^{-1} , die zugehörige symmetrische bei 1085 cm^{-1} (71). Die $\nu_{as} PO_3^{2-}$ der endständigen Phosphatgruppe erscheint als starke Bande bei 1118 cm^{-1} , die $\nu_s PO_3^{2-}$ bei 988 cm^{-1} (71) (79). Die Bande bei 915 cm^{-1} wird der antisymmetrischen P-O-P-Valenzschwingung des Phosphatgerüsts zugeschrieben (71)(77).

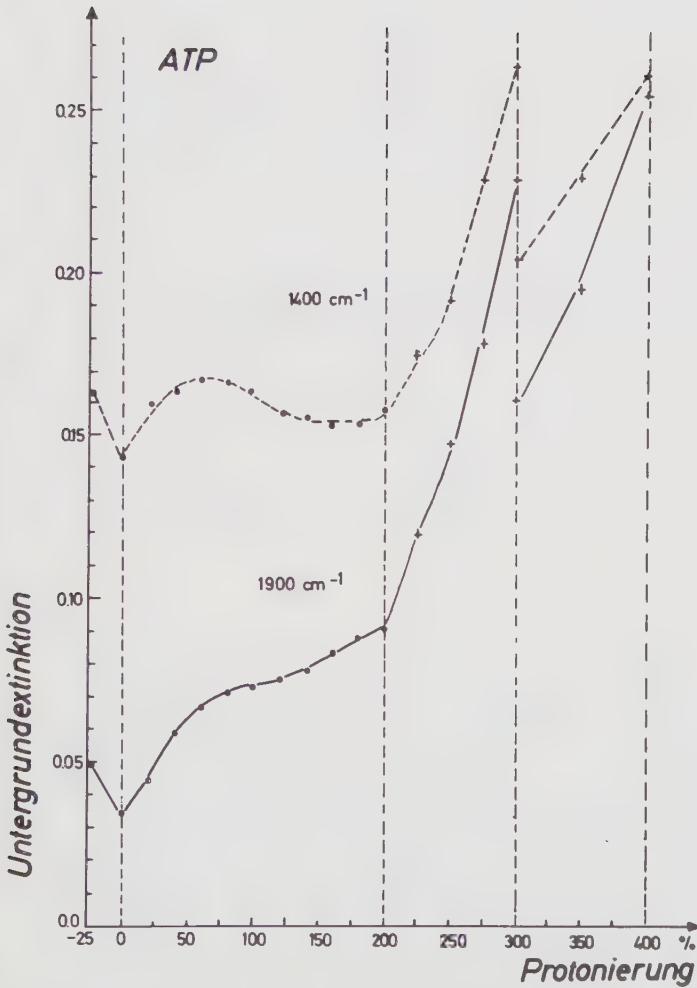
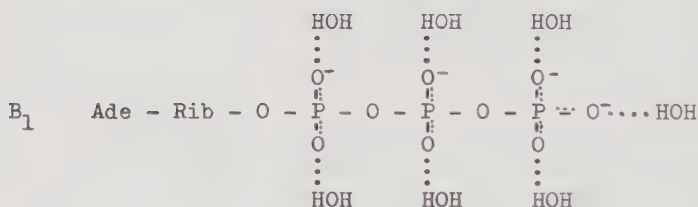


Abb. 16: Verlauf der Untergrundextinktion bei 1900 cm^{-1} und 1400 cm^{-1} für wässrige ATP-Lösung
 -25% bis 300% Protonierung: 1,45 M
 300% bis 400% Protonierung: 1,0 M

Die OH-Valenzschwingung ist gegenüber reinem H_2O deutlich zu kleineren Wellenzahlen verschoben. Die obere Flanke erfährt bei allen Protonierungsgraden eine Verschiebung um ca. 30 cm^{-1} zu kleineren Wellenzahlen. Da sich keine H^+ an den O-Atomen der Phosphatgruppen befinden, werden vom Hydratwasser an diese starke Brücken geknüpft. An der Seite zu kleinen Wellenzahlen erscheint eine starke breite Schulter, die anzeigt, daß die Brücken vom H_2O zum Phosphat stärker sein müssen als zwischen den H_2O -Molekülen. Ähnliches wurde von Chapman und Thirlwell (51) und Schiöberg (16) (45) an ortho-Phosphat beobachtet.

Beim unprotonierten ATP können in wäßriger Lösung Wasserstoff-Brücken (B_1) zum Hydratwasser gebildet werden ⁺):



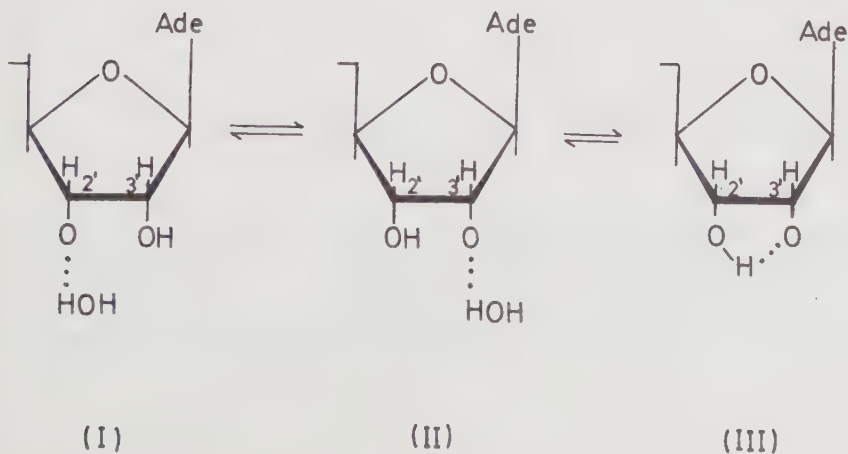
Es sind nur die Wasserstoff-Brücken vom H_2O zu den O-Atomen der Phosphatgruppen eingezeichnet. Ebenso sind auch Brücken vom Adeninring und von der Ribose zum Wasser möglich. Der ΔpK_a für die Wasserstoff-Brücken-Bindung zwischen endständigem Phosphat und Wasser beträgt $15,8 - 6,5 = 9,3$. Die Brücke hat also ein stark unsymmetrisches Potential. Das gleiche gilt für die übrigen Wasserstoff-Brücken von der Phosphatkette zum Wasser. Sie bewirken die OH-Valenzschwingung bei ca. 3100 cm^{-1} . Sie ist sehr breit und erstreckt sich mit ihren Ausläufern relativ weit nach kleinen Wellenzahlen (s. auch Kap. 3.2). Bei den Wasserstoff-Brücken,

⁺) **Ade** = Adenin
Rib = Ribose
(P) = Phosphatgruppe

die sich zwischen dem Wasser und der 2'-OH- bzw. der 3'-OH-Gruppe der Ribose bilden, liegen die OH-Valenzschwingungen auf Grund des noch größeren ΔpK_a im Bereich um 3400 cm^{-1} und sind damit von der intensiven OH-Valenzschwingungsbande des Wassers verdeckt. Dasselbe hat man von den NH-Valenzschwingungen der Amino-Gruppe zu erwarten, die üblicherweise um 3300 cm^{-1} beobachtet werden (10).

4.2.4.2 25% Deprotonierung (Abb. 13)

Eine Zugabe von OH^- -Ionen zum unprotonierten ATP bewirkt, daß die Ribose an der 2'-OH- oder 3'-OH-Gruppe ($pK_a = 12,5$) deprotoniert wird. Es erscheint lediglich eine schwache Bande bei 1040 cm^{-1} . Banden zwischen 1000 und 1100 cm^{-1} sind auf Valenzschwingungen der Ribose mit C-C- und C-O-Anteilen zurückzuführen (69) (70). Die rechte Flanke der OH-Valenzschwingung verschiebt sich noch mehr zu kleineren Wellenzahlen. Die zusätzliche Verbreiterung zeigt, daß sich noch stärkere Wasserstoff-Brücken zum Hydratwasser als von den Phosphatgruppen bilden. Das ist auf Grund des höheren pK_a verständlich. Die Brücken werden also zwischen dem 2'-O- bzw. 3'-O-Atom und dem Wasser gebildet:



Die 2'-OH- und die 3'-OH-Gruppe sind bezüglich Ablösung eines Protons nahezu gleichberechtigt. Es besteht also ein Gleichgewicht zwischen der Form I und II (53). Von Izatt et al. (56) wird auch die Existenz einer innermolekularen Brücke zwischen der 2'-OH- und der 3'-O-Gruppe postuliert (III). Da es sich um eine symmetrische Brücke handelt, könnte sie - neben den Bandenausläufern der OH-Valenzschwingung - den Anstieg der Untergrundextinktion bei 2600 cm^{-1} , 1900 cm^{-1} und 1400 cm^{-1} bewirken.

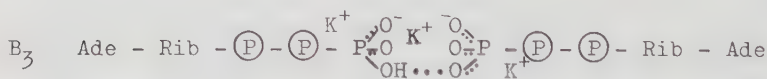
4.2.4.3 50% Protonierung (Abb. 14a, 15a)

Durch Protonenzugabe werden die Intensitäten der $\nu_{\text{as}} \text{ PO}_3^{2-}$ -Schwingung stark reduziert. Die $\nu_{\text{as}} \text{ PO}_2^-$ wird um ca. 5 cm^{-1} zu höheren Wellenzahlen verschoben (1240 cm^{-1}) bzw. verbreitert und nimmt an Intensität zu. Ebenso wird die $\nu_{\text{s}} \text{ PO}_2^-$ -Schwingung bei 1085 cm^{-1} stärker, die bei zunehmender Protonierung in zwei Banden bei 1095 cm^{-1} und 1075 cm^{-1} aufspaltet (18) (71). Aus der PO_3^{2-} -Gruppierung

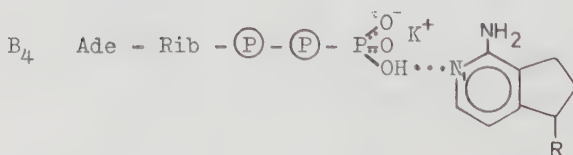
wird also eine $-\text{P}\left(\begin{smallmatrix} \text{O} \\ \text{OH} \end{smallmatrix}\right)^-$ -Gruppe. Die Banden des Adenins

ändern sich nicht.

Die Untergrundextinktion steigt sowohl im Spektralbereich um 1900 cm^{-1} als auch um 1400 cm^{-1} zunächst linear an. Es können sich folgende Wasserstoff-Brücken bilden:



$$\Delta \text{pK}_a = 0$$



$$\Delta \text{pK}_a = 2,5$$

Möglich sind auch Brücken zum Wasser, zur Ribose und zu den anderen O-Atomen der Phosphatkette. Ihr ΔpK_a liegt aber so hoch, daß sie zu unsymmetrisch sind, um leicht polarisierbar zu sein. Die Brücke B_3 hat den niedrigsten ΔpK_a . Es handelt sich um eine geladene Brücke mit im zeitlichen Mittel symmetrischen Potential, die über einen großen Wellenzahlenbereich eine kontinuierliche Absorption bewirkt. Die Brücke B_4 hat ein unsymmetrisches Potential ($\Delta pK_a = 2,5$) und zeigt deshalb nur eine geringe Kontinuumsabsorption bei kleineren Wellenzahlen (1400 cm^{-1}). Der Anstieg bei 1900 cm^{-1} und 1400 cm^{-1} bis ca. 50% Protonierung wird also durch die Ausbildung von Brücken der Art B_3 verursacht. Sie erreichen dann gerade ihre maximale Konzentration. Leicht polarisierbare Wasserstoff-Brücken der Art $(\text{POH}\cdots\text{OP})^-$ wurden von Schiöberg (16) (45) an wäßrigen Lösungen von ortho-Phosphat nachgewiesen (s.Kap. 3.2). Bei niedriger Konzentration (ca. 0,7 M) wurden nur ganz geringe Veränderungen am Spektrenuntergrund beobachtet (18) in diesem Protonierungsbereich, was auf die Ausbildung zwischen- und nicht innermolekularer H-Brücken schließen läßt.

Die stark negativen Ladungen der Phosphatgruppen müssen durch die K^+ -Ionen kompensiert werden, da sonst die elektrostatische Abstoßung zu groß ist. Ultraschall-Relaxationsmessungen von Funck (95) zeigen, daß sich einwertige Kationen zwischen die O-Atome einlagern. Es werden Dimere gebildet durch Wechselwirkung der Phosphatketten untereinander. Die Röntgenbeugungs-Untersuchungen an Kristallen (65) (66) lassen ebenfalls erkennen, daß sich die Na^+ -Ionen zwischen den negativen Ladungen befinden.

Die symmetrischen, leicht polarisierbaren Wasserstoff-Brücken B_3 in den Dimeren bewirken also zunächst die Anhebung des Untergrundes über einen größeren Wellenzahlenbereich. Banden, im Spektralbereich um 1900 cm^{-1} , die die Anhebung des Untergrundes bewirken können, sind nicht zu erkennen.

4.2.4.4 100% Protonierung (Abb. 14a, 15a)

Bei weiterer Protonenzugabe werden die $(\text{POH} \cdots \text{OP})^-$ -Brücken wieder abgebaut, und es bilden sich Brücken zum Akzeptor mit dem nächst niedrigeren pK_a -Wert aus. Das ist der N_1 -Stickstoff des Basenrestes. Diese Brücken B_4 sind wesentlich unsymmetrischer als die Brücken B_3 und zeigen deshalb nur im oberen Wellenzahlenbereich eine kontinuierliche Absorption (1900), während sie im unteren Wellenzahlenbereich nicht erscheint. Es machen sich auch bereits frühzeitig Veränderungen an den Banden des Basenrestes bemerkbar, die sonst charakteristisch für eine Protonierung sind (Abb. 17). Diese zeigen eine Beeinflussung des Basenrestes an, bevor die eigentliche Protonierung beginnt. Das gleiche wurde von Hofmann (18) an IR-Spektren von hydratisierten Filmen von ADP und ATP beobachtet. Es wurde dort auf die Angleichung der pK_a -Werte von endständigem Phosphat und Basenrest zurückgeführt. Wahrscheinlicher erscheint die Erklärung, daß ebenfalls die Ausbildung von $(\text{OH} \cdots \text{N})$ -Brücken dafür verantwortlich ist.

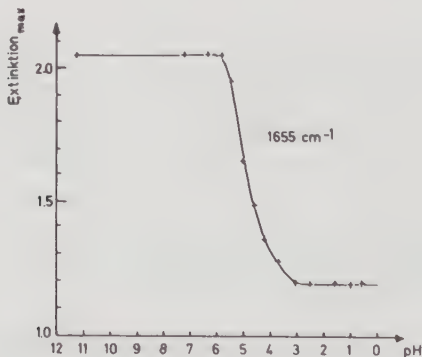
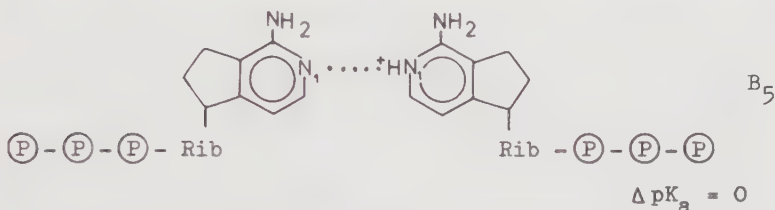


Abb. 17: Titrationskurve der Adeninbande des ATP (1,45 M) bei 1655 cm^{-1}

4.2.4.5 Der Bereich 100 - 200% (Abb. 14b, 15b)

In diesem Bereich wird der Basenring protoniert (s. Kap. 4.2.3.1). Die Banden bei 1695 cm^{-1} und 1510 cm^{-1} werden stärker, während die Banden bei 1655 cm^{-1} und 1480 cm^{-1} verschwinden. Bei 150% Protonierung könnten sich leicht polarisierbare Wasserstoff-Brücken der Art $(\text{NH}\cdots\text{N})^+$, wie sie von Seßler (15) am Purin gefunden wurden, ausbilden (B_5):



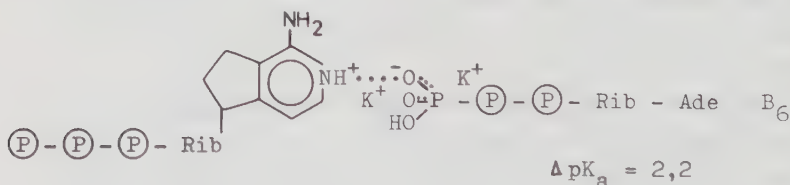
Aus Röntgenbeugungsuntersuchungen von Watson et al. (96) an Purinkristallen geht hervor, daß die planaren Ringe übereinander in der exakt gleichen Anordnung und Richtung gestapelt werden ("stacking"), d. h. der Imidazol-Ring befindet sich über dem Imidazol-Ring des nächsten Moleküls und ebenso liegen die Pyrimidin-Ringe übereinander. Der Abstand der Basenebenen beträgt $3,38\text{ \AA}$. Durch diese Anordnung können sich zwischen den N_1 -Atomen $(\text{NH}\cdots\text{N})^+$ -Brücken bilden, die wegen des symmetrischen Potentials ($\Delta pK_a = 0$) über einen großen Wellenzahlenbereich eine kontinuierliche Absorption zeigen (15) (s. Kap. 3.2).

Beim ATP ist bei 1900 cm^{-1} ein linearer Anstieg der Untergrundextinktion mit der Protonierung zu beobachten, während sie bei 1400 cm^{-1} fast konstant bleibt. Daraus geht hervor, daß Brücken der Art B_5 nicht gebildet werden, da sie wegen der hohen Symmetrie des Potentials auch im Wellenzahlenbereich um 1400 cm^{-1} eine Kontinuumsabsorption zeigen müßten. Sie werden beim ATP durch das andersartige "stacking" der Adeninringe (87) - hervorgerufen durch die Substitution der Aminogruppe am C_6 -Atom - verhindert. Kennard et al. (65) (66) (s. Kap. 4.2.2) zeigten mit Hilfe von Röntgenbeugung an ATP-Kristallen, daß die Basenreste in entgegengesetzter Richtung übereinander gestapelt werden. Dabei wird der Imidazol-Ring

in einem Abstand von 3,5 Å über dem Pyrimidin-Ring angeordnet. Die freie Wechselwirkungsenthalpie liegt bei 10,2 kcal/Mol, einem der höchsten Werte bei solchen Heterozyklen. Bugg (87) konnte ein Überlappen der NH_2 -Gruppe mit dem Imidazol-Ring beim Adenosin und AMP feststellen, also eine gegenüber dem obigen "stacking" leicht verschobene Anordnung. In allen Fällen gibt es keine Möglichkeit der Wasserstoff-Brücken-Bindung der N_1 -Stickstoffe der gestackten Moleküle untereinander.

Die Banden bei 2700 cm^{-1} und 2380 cm^{-1} treten stark hervor. Sie werden von Witkop (82) auf Schwingungen der Gruppierung $\text{C}=\text{NH}^+$ zurückgeführt. Wood (92)(92a) ordnet sie $(\text{NH}\cdots\text{N})^+$ -Brücken zu, was allerdings unwahrscheinlich ist, da diese H-Brücken ein Kontinuum und nicht Banden verursachen sollten (12). Andere Autoren (84) schreiben sie Ober- und Kombinationsschwingungen der δ - und γ -Deformationsschwingung der NH-Gruppe zu, die durch Fermi-Resonanz mit der NH-Valenzschwingung verstärkt werden.

Der lineare Anstieg der Untergrundextinktion bei 1900 cm^{-1} könnte durch die Ausbildung von zwar unsymmetrischen, aber immer noch leicht polarisierbaren Wasserstoff-Brücken B_6 verursacht werden:



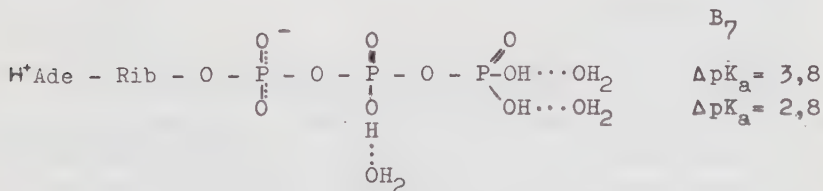
Nach den Untersuchungen von Lindemann (43) an $(\text{OH}\cdots\text{N})$ -Brücken haben solche Brücken im wässrigen Medium ein relativ symmetrisches Potential bei einem ΔpK_a von 2. Bei den Brücken B_6 liegt dieser Fall gerade vor, so daß diese Brücken noch leicht polarisierbar sein müssen.

In Kristallen des zweifach protonierten ATP sind ebenfalls Brücken zwischen dem N₁-Stickstoff und einem O-Atom der negativ geladenen, endständigen Phosphatgruppe nachgewiesen worden (66) (s. Kap. 4.2.2). Auch in anderen Nukleotiden, in denen die Base am N₁-Stickstoff protoniert ist, werden H-Brücken zwischen dem Phosphat eines anderen Moleküls und diesem N₁-Proton gebildet (98). Sie haben eine stabilisierende Wirkung auf das Basenstacking (101).

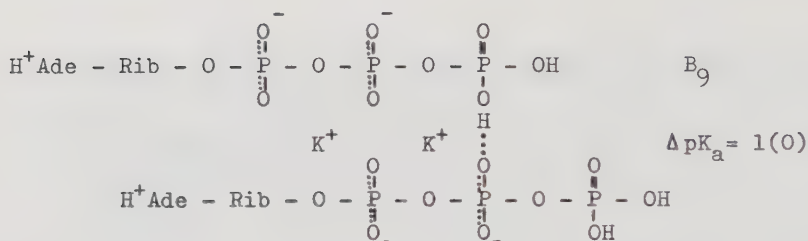
4.2.4.6 Der Bereich 200 - 400% Protonierung (Abb. 150,d)

In der 3. und 4. Stufe wird die Phosphatkette weiter protoniert. Die asymmetrische und die symmetrische Valenzschwingung der PO_2^- -Gruppe bei 1240 cm^{-1} und 1095 cm^{-1} bzw. 1075 cm^{-1} werden abgesenkt, während die breiten Banden der P(OH) -Schwingung bei ca. 1050 cm^{-1} und der $\nu\text{P(OH)}_2$ bei ca. 950 cm^{-1} zunehmen. Insgesamt werden die Banden verbreitert, was auf die Bindung durch H-Brücken schließen läßt.

In diesem Bereich erfolgt ein steiler Anstieg der Untergrundextinktion bei 1900 und 1400 cm^{-1} . Es können sich H-Brücken zwischen den OH-Gruppen des Phosphatrestes als Donoren und den Wassermolekülen als Akzeptoren bilden (B_7):



Am Kalottenmodell kann man zeigen, daß auch intramolekulare Brücken zwischen α - und γ -Phosphat möglich sind (B_8). Der ΔpK_a liegt bei 1. Außerdem sind H-Brücken zwischen zwei oder mehreren Phosphatketten möglich (B_9):



Alle diese H-Brücken haben einen ΔpK_a , der anzeigt, daß die Brücken zwar unsymmetrisch, aber immer noch leicht polarisierbar sind. Sie sind also damit die Ursache für den starken Anstieg der Untergrundextinktion. Untersuchungen an ortho-Phosphorsäure von Schiöberg (16) (45) zeigen, daß sowohl Brücken von der Phosphorsäure zum Wasser ($\hat{=}$ B₇) als auch von Phosphorsäuremolekülen untereinander ($\hat{=}$ B₉) gebildet werden. Der letzte pK_a liegt dort bei 2,1. Assoziat der Art B₈ erfordern, daß die stark negativen Ladungen durch die Kationen kompensiert werden, d. h. eine Einlagerung der K⁺-Ionen zwischen die O-Atome der Phosphatkette erfolgt. Welche der Brücken den größten Anteil an der Kontinuumsabsorption hat, ist mit Hilfe der Messungen nicht zu entscheiden.

4.2.5 IR-Spektren von ADP

Die Abb. 17 gibt die IR-Spektren von 1,0 M wäßriger ADP-Lösung von 0 - 300% Protonierung wieder. In Tab. 1 sind die pK_a -Werte von ADP mitangegeben. Sie liegen etwas unter denen von ATP, was auf die geringere Elektronegativität zurückzuführen ist (52). Die beiden letzten pK_a -Werte entsprechen denen von ATP. Sie sind aber wie beim ATP relativ ungenau (6) (s. Kap. 4.2.1). Ein Vergleich der Banden beim ATP und ADP ergibt folgende Unterschiede (s. Tab. 3):

- 1) Die Banden des Basenringes liegen bei den gleichen Wellenzahlen.

- 2) Die $\nu_{as} PO_2^-$ verschiebt sich mit der Protonierung beim ATP von 1235 cm^{-1} nach 1240 cm^{-1} . Beim unprotonierten ADP liegt sie bei 1215 cm^{-1} . Mit der Protonierung steigt eine Bande bei 1250 cm^{-1} stark an, überlagert sich mit derjenigen bei 1215 cm^{-1} zu einer breiten Banden mit dem Maximum bei 1224 cm^{-1} .
- 3) Die $\nu_s PO_2^-$ ist beim unprotonierten ATP bereits zu erkennen. Sie spaltet mit der Protonierung in Banden bei 1095 und 1075 cm^{-1} auf. Beides ist beim ADP nicht der Fall. Die $\nu_s PO_2^-$ liegt bei 1080 cm^{-1} .
- 4) Die $\nu_s PO_2^{2-}$ findet man beim ATP bei 988 cm^{-1} , beim ADP bei 1015 cm^{-1} .
- 5) Die $\nu_{as} P-O-P$ liegt im ATP bei 915 cm^{-1} und verschiebt sich mit der Protonierung nach 905 cm^{-1} , während sie beim ADP von 936 nach 925 cm^{-1} verschoben wird.

An diesen charakteristischen Merkmalen lassen sich ATP und ADP deutlich voneinander unterscheiden. Dies ist besonders wichtig im Hinblick auf die Untersuchung der Hydrolyse von ATP, um zwischen den Zerfallsprodukten ADP und ATP unterscheiden zu können.

4.2.6 IR-Kontinuumsabsorption von wäßrigen H_nK_{3-n} ADP-Lösungen ($0 \leq n \leq 3$)

In Abb. 18 ist der Verlauf der Untergrundextinktion bei 1900 cm^{-1} und 1400 cm^{-1} für wäßrige $1,0\text{ M}$ ADP-Lösungen in Abhängigkeit von der Protonierung aufgetragen. Bei 1900 cm^{-1} steigt die Untergrundextinktion zunächst nur schwach an, ab 100% Protonierung dann stärker und ab 200 - 300% Protonierung sehr steil. Bei 1400 cm^{-1} bleibt die Untergrundextinktion bis 200% fast konstant, um dann ebenso wie bei 1900 cm^{-1} anzusteigen.

4.2.6.1 0 - 100% Protonierung (Abb. 17a)

Beim ADP ist in diesem Protonierungsbereich bei den maximal erreichbaren Konzentrationen ($1,0\text{ M}$) kein Maximum der Kontinuumsabsorption bei ca. 50% Protonierung zu beobachten, das auf die Ausbildung von symmetrischen, leicht pola-

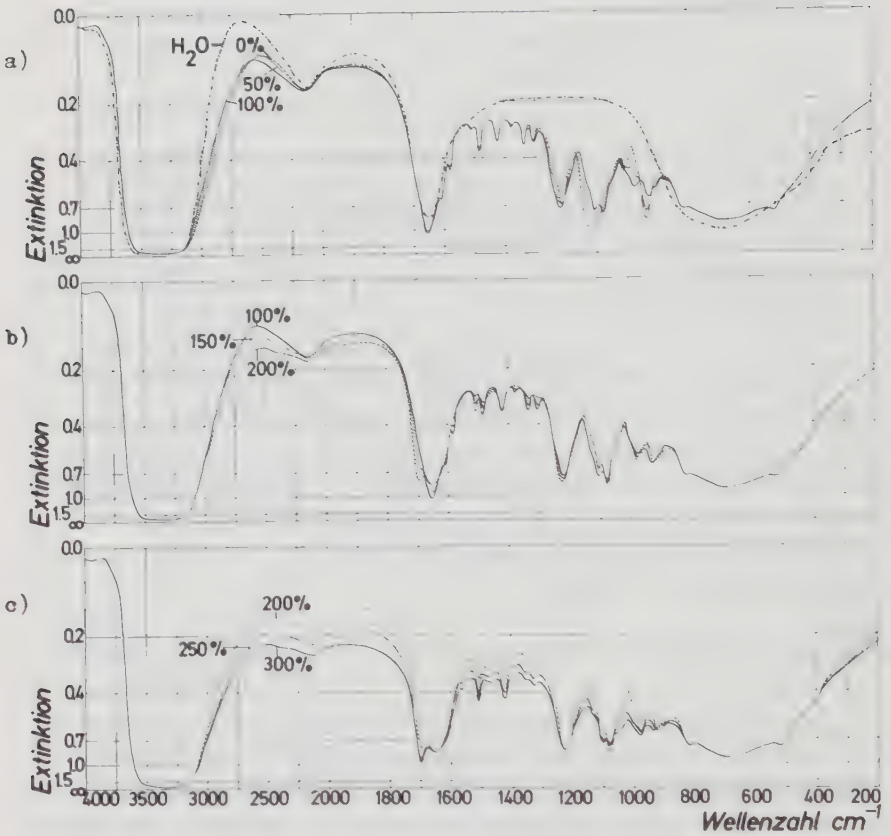


Abb. 17: IR-Spektren von wässrigen $K_{3-n}H_n$ ADP-Lösungen
($0 \leq n \leq 3$); 1,0 M; 10°C; Si-Küvette (Schicht-
dicke 12,1 μm)

risierbaren Wasserstoff-Brücken ($\text{POH} \cdots \text{OP}^-$) zwischen den Phosphatketten schließen läßt (s. Kap. 4.2.4.3). Ein schwacher Anstieg bei 1900 cm^{-1} scheint auf die Formation von ($\text{OH} \cdots \text{N}$)-Brücken hinzudeuten. Außerdem tauchen auch beim ADP die Banden des protonierten Basenrestes vor der vollen Protonierung des endständigen Phosphats auf (Abb. 17a). H-Brücken der Art ($\text{OH} \cdots \text{N}$) scheinen also nicht so stark konzentrationsabhängig zu sein wie die ($\text{POH} \cdots \text{OP}^-$)-Brücken.

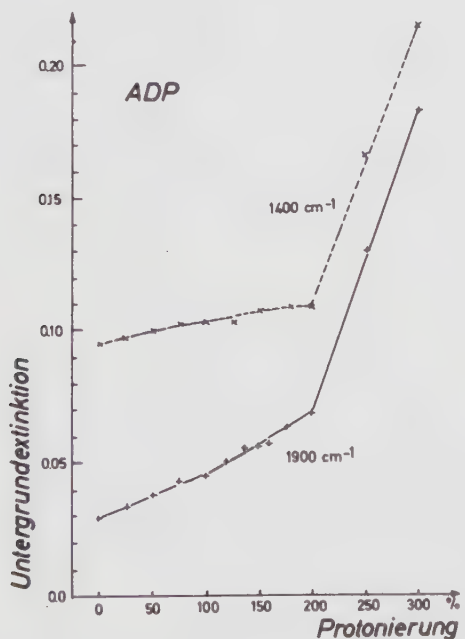


Abb. 18: Verlauf der Untergrundextinktion bei 1900 cm^{-1} und 1400 cm^{-1} für 1,0 M ADP-Lösung

Der schwache Anstieg bei 2600 cm^{-1} und 1900 cm^{-1} ist auch auf Banden von Kombinations- und Oberschwingungen der POH-Deformationsschwingungen zurückzuführen, die durch Fermi-resonanz mit der OH-Valenzschwingung verstärkt werden (49) (50).

4.2.6.2 100 - 200% Protonierung (Abb. 17b)

Im Protonierungsbereich des Basenrestes steigt die Untergrundextinktion bei 1900 cm^{-1} linear an, während sie bei 1400 cm^{-1} relativ konstant bleibt. Der Befund ist der gleiche wie beim ATP. Es werden also keine $(\text{NH}\cdots\text{N})^+$ -Brücken zwischen den N_1 -Stickstoffen gebildet. Untersuchungen an Kristallen (87) zeigen, daß in AMP und ADP die NH_2 -Gruppe über den Imidazol-Ring angeordnet wird ("stacking"). Der Anstieg der Untergrundextinktion nur im höheren Wellenzahlenbereich zeigt an, daß unsymmetrische aber leicht polarisierbare H-Brücken der Art $\text{NH}^+\cdots\text{O}^-$ zwischen dem N_1 -Stickstoff und dem Phosphatrest eines anderen Moleküls gebildet werden (98). Am Basenrest protoniertes ADP und ATP verhalten sich also, trotz der unterschiedlichen Konzentration, bezüglich der Ausbildung leicht polarisierbarer Wasserstoff-Brücken gleich (s. Kap. 4.2.4.5).

4.2.6.3 200 - 300% Protonierung (Abb. 17c)

Ab 200% Protonierung setzt ein steiler linearer Anstieg sowohl bei 1900 cm^{-1} als auch bei 1400 cm^{-1} ein. Er wird durch die leicht polarisierbaren Wasserstoff-Brücken B_7 zwischen der Phosphatkette und dem Wasser sowie zwischen den O-Atomen der Phosphatkette selbst (B_8 , B_9) verursacht. Es bilden sich also ganz analoge H-Brücken wie beim ATP (s. Kap. 4.2.4.3).

Zusammenfassend ergibt sich, daß sich ATP und ADP bezüglich der Ausbildung leicht polarisierbarer Brücken im Protonierungsbereich von 100 - 300% gleich verhalten, während leicht polarisierbare H-Brücken zwischen den halbprotonierten endständigen Phosphatgruppen bei den vorliegenden Konzentrationen nur beim ATP nachgewiesen werden konnten.

4.2.7 Mg^{2+} -Komplexe von ATP und ADP

Zusätzlich zu den K^+ -Salzen von ATP und ADP wurden deren Komplexe mit Mg^{2+} IR-spektroskopisch untersucht. Im Stoffwechsel tritt ATP zu einem hohen Anteil als 1:1-Komplex mit Mg^{2+} oder Ca^{2+} auf (z. B. liegen im Muskel 90% des ATP als MgATP vor (99)). Die pK_a -Werte von MgATP und MgADP sind ebenfalls in Tab. 1 wiedergegeben. Man sieht, daß sich der pK_a -Wert für das endständige Phosphat durch die Anlagerung des Mg^{2+} -Ions stark absenkt, während er für die Basenringprotonierung nur eine geringe Veränderung erfährt. Nach übereinstimmender Meinung vieler Autoren (52) (53) erfolgt die Komplexbildung fast ausschließlich an den Phosphatgruppen. Allerdings ist eine indirekte Wechselwirkung mit dem Basenrest über die Hydrathülle nicht ausgeschlossen (100).

4.2.8 IR-Spektren von MgATP

In den Abb. 19 und 20 sind die IR-Spektren von 0,25 M und 0,85 M wäßrigen Lösungen von MgATP wiedergegeben. In Tab. 2 sind die Bandenlagen und ihre Zuordnung eingetragen. Ein Vergleich der Spektren des K^+ -Salzes mit denen des Mg^{2+} -Komplexes ergibt folgendes Bild (jeweils 0,25 M Lösung) (Abb. 21): Bei 0% Protonierung sind die Banden des Adenins identisch. Die $\nu_{\text{as}} \text{PO}_2^-$ ist jedoch von 1235 cm^{-1} nach 1243 cm^{-1} , die $\nu_{\text{as}} \text{PO}_3^{2-}$ von 1118 cm^{-1} nach 1225 cm^{-1} und die $\nu_{\text{s}} \text{PO}_2^-$ von 1085 cm^{-1} nach 1090 cm^{-1} verschoben. Außerdem sind die Banden des Mg^{2+} -Komplexes weniger intensiv. Brintzinger (72) hat diese Verschiebung und Absenkung auf die sogenannte "lokale Hydrolyse" zurückgeführt, bei der ein Teil des Hydratwassers durch die Komplexbildung zweiwertiger Kationen mit der Phosphatkette gespalten werden soll. Die Spektren der Abb. 19 zeigen, daß bereits bei 25% Protonierung eine Abnahme der charakteristischen $\nu_{\text{as}} \text{PO}_3^{2-}$ -Bande festzustellen ist. Die endständige Phosphatgruppe wurde also protoniert.

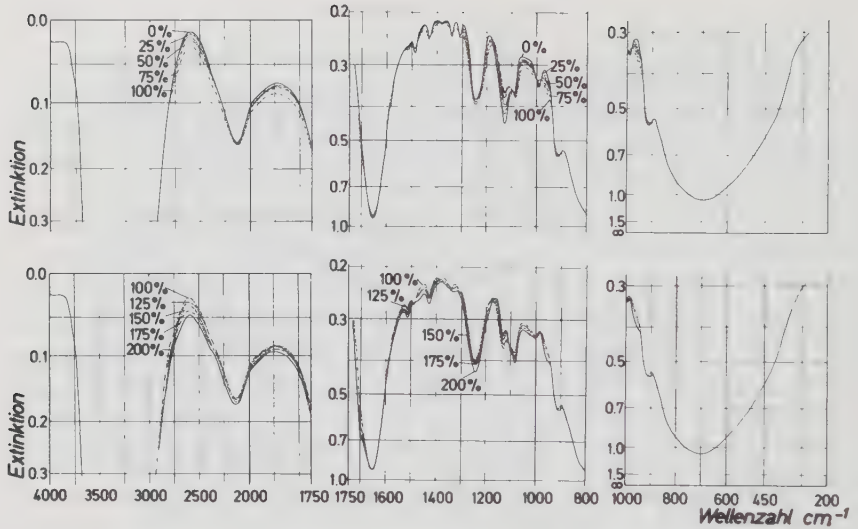


Abb. 19: IR-Spektren von wässrigen $\text{MgK}_{2-n}\text{H}_n\text{ATP}$ -Lösungen ($0 \leq n \leq 2$); 0,25 M; 10°C; Si-Küvette (12,1 μm Schichtdicke)

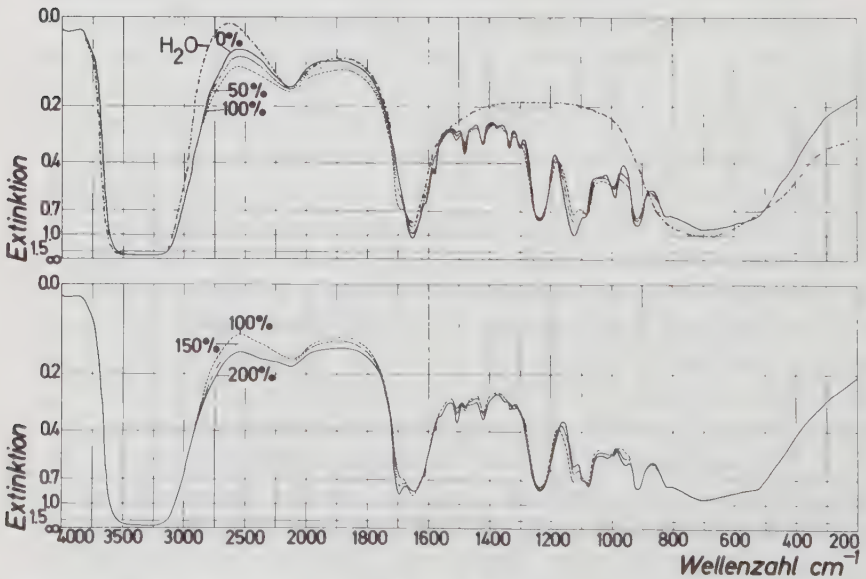
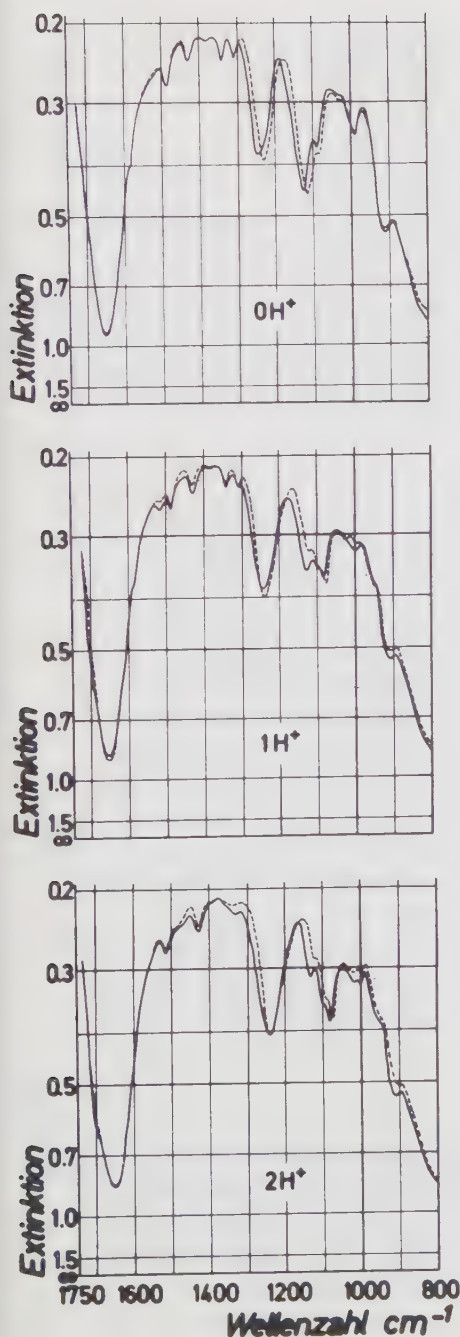


Abb. 20: IR-Spektren von wässrigen $\text{MgK}_{2-n}\text{H}_n\text{ATP}$ -Lösungen ($0 \leq n \leq 2$); 0,85 M; 10°C; Si-Küvette (12,1 μm Schichtdicke)



Die "lokale Hydrolyse" kann also bis höchstens 20% Protonierung eine Rolle spielen. Mit zunehmender Protonierung nimmt die Bande weiterhin kontinuierlich ab, während die Bande bei 1085 cm^{-1} zunimmt. Da die beiden ersten pK_a -Werte nahe beieinander liegen, erfolgt neben der Protonierung des endständigen Phosphats bereits auch eine des Basenrestes. Das läßt sich gut an dem Vergleichsspektrum in Abb. 21 für ein H^+ sehen (Absenkung der Bande bei 1655 cm^{-1} und 1480 cm^{-1} für den Mg^{2+} -Komplex). Außerdem sieht man, daß die Phosphatbanden des Mg^{2+} -Komplexes immer noch bei höheren Wellenzahlen liegen als beim K^+ -Salz. Das zeigt an, daß trotz Bindung eines Protons an das γ -Phosphat noch eine Wechselwirkung Mg^{2+} -Phosphatkette existieren muß. In der Tat beträgt der Logarithmus der Bindungskonstanten für die Bindung von Mg^{2+} an HATP^- immer noch 2,24 (89) (s. Tab. 4). Es muß allerdings berücksichtigt werden, daß das γ -Phosphat noch nicht vollständig mit einem H^+ besetzt ist.

Abb. 21: Vergleich der IR-Spektren des ATP mit MgATP (0,25 M. Lösung)

..... ATP
 ————— MgATP

	$\log K_{\text{MgL}}$	$\log K_{\text{MgHL}}$	μ
MgATP	4,22 (89)	2,24 (89)	0,1
	5,83 (58)	3,60 (58)	0,0
MgADP	3,17 (88)	1,64 (88)	0,1
	4,27 (58)	2,57 (58)	0,0
MgPO ₄		1,88 (61)	0,2
		2,47 (58)	0,0

Tabelle 4: Bindungskonstanten für Mg^{2+} an ATP, ADP und ortho-Phosphat (25°C)

Bei 200% Protonierung sind sowohl Base als auch endständiges Phosphat in beiden Fällen (K^+ , Mg^{2+}) einfach protoniert. Die Adeninbanden sind fast gleich stark, während die Phosphatbanden etwas verbreitert (bei 1240 cm^{-1}) oder immer noch zu höheren Wellenzahlen verschoben bleiben (um 1100 cm^{-1}). Es muß also auch bei einfacher Protonierung des γ -Phosphats eine Wechselwirkung des Mg^{2+} mit der Phosphatkette vorhanden sein. Das kann über die noch verbleibenden negativen Ladungen an den O-Atomen geschehen. Weiterhin zeigen die Spektren, daß eine Wechselwirkung von Base mit Mg^{2+} nicht oder nur sehr schwach besteht. Das geht z. B. auch aus thermodynamischen Messungen von Frey und Stuehr (90) hervor. Daß die Wechselwirkung von Mg^{2+} mit ATP bei Protonierung im gewissen Maße erhalten bleiben muß, ist auch an der pH-Abhängigkeit zu erkennen (Abb. 9). Der Abstand der beiden Kurven für das ATP und das MgATP bleibt von 0 - 200% Protonierung erhalten.

4.2.9 IR-Spektren von MgADP

Hofmann (18) zog die Messungen von Brintzinger (72) (s. Kap. 4.2.8) zur Deutung seiner Spektren von wäßrigen 0,3 M Lösungen von MgADP heran und postulierte ebenfalls

für MgADP eine "lokale Hydrolyse". Ein Vergleich seiner Spektren mit denen der Abb. 22 ergibt folgende Unterschiede:

- 1) Das Spektrum von 0% bei Hofmann stimmt mit demjenigen von 100% der Abb. 22 überein.
- 2) Das Spektrum von 100% bei Hofmann stimmt mit demjenigen von 200% der Abb. 22 überein.

Daraus läßt sich schließen, daß die Ausgangssubstanz von Hofmann bereits 1 H^+ enthält. Er stellte Mg_3ADP_2 mit Mg^{2+} beladenem, stark saurem Ionenaustauscher her. Als Ausgangssubstanz diente H_3ADP der Fa. Boehringer GmbH Mannheim. Eine Überprüfung ergab eine sehr hohe Reinheit dieser Substanz. Die Bindungskonstante des ADP für H^+ ist größer als für Mg^{2+} (s. Tab. 1 und Tab. 4), so daß kein vollständiger Austausch erfolgte. Es wird deshalb angenommen, daß an Stelle des Mg_3ADP_2 ein $MgHADP$ vorlag.

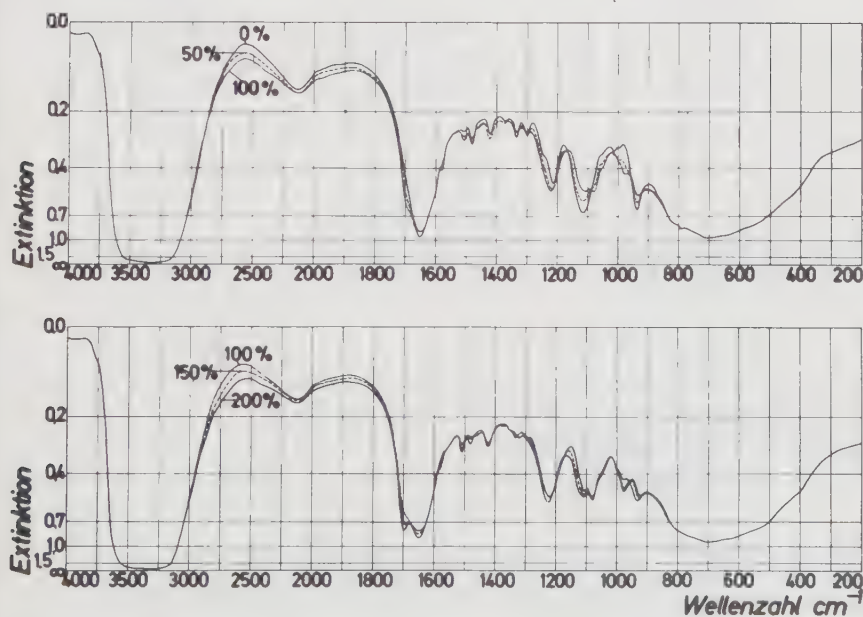
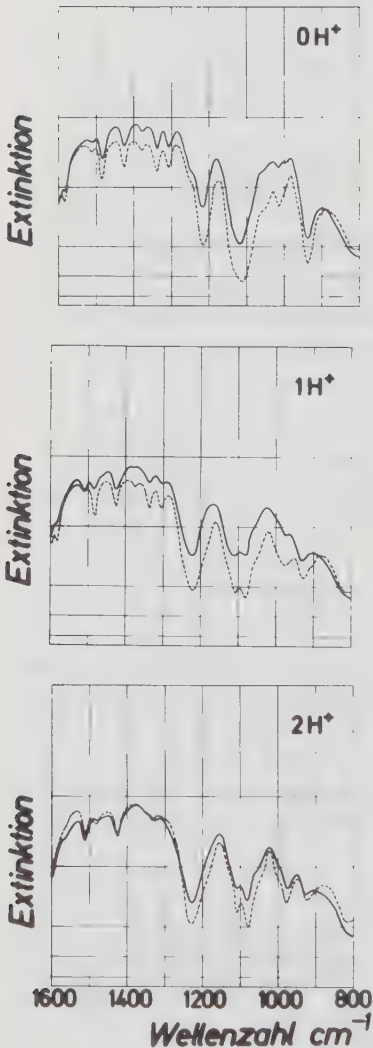


Abb. 22: IR-Spektren von wäßrigen $MgK_{2-n}H_nADP$ -Lösungen ($0 \leq n \leq 2$); 0,6 M; 10°C; Si-Küvette (12,1 μm Schichtdicke)



In Abb. 23 sind die Spektren im Wellenzahlenbereich der Basen- und der Phosphatbanden von MgADP mit denjenigen des K^+ -Salzes des ADP verglichen. Die Konzentrationen liegen bei 1,0 M (ADP) und 0,6 M (MgADP). Der Vergleich kann deshalb nur qualitativ sein. Im Gegensatz zu MgATP zeigt sich keine Verschiebung der Phosphatbanden in allen Protonierungsstufen. Das läßt auf ein unterschiedliches Koordinationsverhalten des Mg^{2+} zur Phosphatkette des ADP schließen. Die Bindungskonstante ist immer noch beträchtlich, liegt aber unter der von ATP. Eine "lokale Hydrolyse" kann also beim MgADP keine oder eine nur sehr viel geringere Rolle als beim MgATP spielen.

Abb. 23: Vergleich der IR-Spektren des ADP mit MgADP
 ADP (1,0 M)
 ——— MgADP (0,6 M)

4.2.10 IR-Kontinuumsabsorption von wäßrigen $\text{MgK}_n\text{H}_{2-n}\text{ATP}$ -Lösungen ($0 \leq n \leq 2$)

In Kap. 4.2.4 konnte gezeigt werden, daß in wäßrigen Lösungen von ATP leicht polarisierbare Brücken der Form $\text{OH} \cdots \bar{\text{O}}$ und $\text{NH}^+ \cdots \bar{\text{O}}$ auftreten. Im physiologischen pH-Bereich werden H-Brücken zwischen den endständigen Phosphatgruppen geknüpft. Der Verlauf der Untergrundextinktion mit der Protonierung für das MgATP ist in Abb. 24 dargestellt.

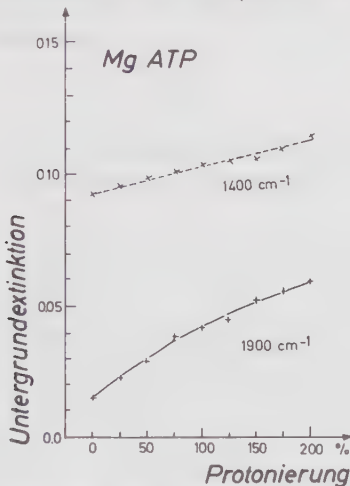


Abb. 24: Verlauf der Untergrundextinktion bei 1900 cm^{-1} und 1400 cm^{-1} in Abhängigkeit von der Protonierung für MgATP (0,85 M)

Ein Maximum wie beim nicht komplexgebundenen ATP (s. Kap. 4.2.4), das auf die Ausbildung leicht polarisierbarer H-Brücken zwischen den Phosphat-O-Atomen schließen läßt, ist nicht zu beobachten. Die Konzentration liegt allerdings noch tiefer (0,85 M) als beim ADP (s. Kap. 4.2.6).

Durch die fast parallele Protonierung von Basenrest und γ -Phosphat können sich von Beginn der Protonierung an auch H-Brücken vom N_1 -Stickstoff ausbilden. Der ΔpK_a für $\text{NH}^+ \cdots \bar{\text{O}}$ -Brücken vom Basenrest zur Phosphatkette liegt in der Größenordnung von 2. Eine exaktere Angabe ist wegen

der fehlenden Werte für die 3. und 4. Protonierungsstufe nicht möglich.

Ebenso sind auch Brücken der Art $\text{POH} \cdots \text{N}$ vom γ -Phosphat zum Basenrest möglich. Durch die Absenkung des pK_a der endständigen Phosphatgruppe um ca. 2 Einheiten (s. Tab. 1) wird das Potential in diesen Brücken symmetrischer als beim nicht Mg^{2+} -komplexgebundenen ATP.

Insgesamt ergibt sich, daß beim MgATP sowohl H-Brücken vom protonierten γ -Phosphat zum Stickstoff als auch vom protonierten Basenrest zu einem anderen O-Atom der Phosphatkette geknüpft werden können.

4.2.11 Vergleich des Verlaufes der Untergrundextinktion für die verschiedenen Substanzen untereinander

In Kap. 3 wurde der Zusammenhang zwischen der Intensität der Kontinuumsabsorption und dem pK_a der an den Wasserstoff-Brücken beteiligten Gruppen geklärt. Unterhalb einem pK_a -Wert von 0 bleibt die Intensität der Kontinuumsabsorption auf einem maximalen Wert, der dem H_5O_2^+ zugeschrieben wird. Ein Vergleich der in den vorangegangenen Kapiteln untersuchten Untergrundextinktionen mit dem Maximalwert, der durch die Wasserstoff-Brücken im H_5O_2^+ verursacht wird, ist in Abb. 25 dargestellt.

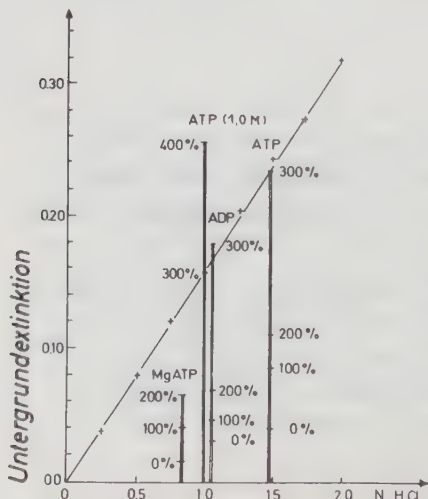


Abb. 25: Vergleich der Intensität der Untergrundextinktion für die verschiedenen Substanzen und Protonierungsstufen mit dem Maximalwert des H_5O_2^+

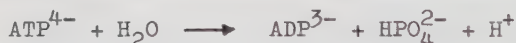
Die Untergrundextinktion hängt bei den hier betrachteten Konzentrationen nahezu linear von der Normalität der HCl-Lösung und damit von der Konzentration an H_5O_2^+ ab. Der Zusammenhang ist durch die in Abb. 25 eingezeichnete Gerade wiedergegeben. 1 N HCl entspricht, da das H^+ vollständig abdissoziiert ist, 1 M H_5O_2^+ . Die Stärke der Untergrundextinktion von ATP, ADP und MgATP ist für die verschiedenen Protonierungsstufen als Balken eingezeichnet.

Bereits bei 0% zeigt sich eine sogenannte Restabsorption, die auf Bandenausläufer zurückzuführen ist (s. Kap. 3). Auch für die folgenden Protonierungsstufen ist ein gewisser Anteil der Untergrundextinktion Banden oder Bandenausläufern zuzuschreiben (s. Kap. 4.2).

Für die ersten beiden Stufen liegt die Untergrundextinktion weit unter der von H_5O_2^+ . (Der Anstieg für das ADP und MgATP ist wegen der niedrigeren Konzentration entsprechend geringer als beim ATP.) In der dritten Stufe erreicht die Untergrundextinktion den Wert von H_5O_2^+ . Der Anteil der Protonierung bis 200% ist dabei allerdings nicht abgezogen, so daß man effektiv eine geringere Anhebung erhält. Eine noch weitergehende Protonierung bis zu 400% beim ATP (1,0 M) ergibt einen größeren Wert als er für H_5O_2^+ beobachtet wird. Da die beiden letzten pK_a -Werte sehr nahe beieinander liegen, tragen die von beiden gebildeten Wasserstoff-Brücken zur Kontinuumsabsorption bei. Der Anstieg von 200% nach 300% ist etwa genau so groß wie der von 300 nach 400%. Das zeigt, daß beide Akzeptoren nebeneinander an der Ausbildung leicht polarisierbarer Wasserstoff-Brücken beteiligt sind.

4.3 IR-spektroskopische Untersuchung der Hydrolyse von $K_{4-n}H_nATP$ und $MgK_{2-n}H_nATP$ in wässriger Lösung ($0 \leq n \leq 2$)⁺

In der Einleitung zu Kap. 4 wurde eingehend dargelegt, welche Theorien zu dem in der Bioenergetik so zentralen Begriff der "energiereichen Bindung" entwickelt worden sind. Weniger starkes Augenmerk ist auf die Untersuchung des eigentlichen Hydrolysevorganges gerichtet worden. Wir müssen dabei trennen zwischen den enzymatisch gesteuerten Vorgängen (z. B. ATPasen im Muskel) (33) und der nichtenzymatischen Hydrolyse (104) (105), also dem "spontanen" Zerfall des ATP. Dieser läßt sich, wie von Hofmann (17) gezeigt und in Kap. 2.8 ausführlich diskutiert, durch Temperaturerhöhung beschleunigen. Bei nicht zu hohen Temperaturen findet fast ausschließlich ortho-Phosphat-Hydrolyse statt, die nach dem Schema verläuft:



Entsprechendes gilt für die Hydrolyse des Mg^{2+} -Komplexes des ATP:



Die bei der Hydrolyse entstehenden Protonen binden an die Zerfallsprodukte. Aus den Spektren kann man den Ort der Bindung entnehmen. Je nach Ausgangsprotonierung und Wechselwirkung mit den Kationen (K^+ , Mg^{2+}) sind verschiedene Bindungsplätze bevorzugt. Außerdem sind Aussagen über Wasserstoff-Brücken-Bindungen zwischen den Zerfallsprodukten zu erwarten.

Es wurden deshalb Reihen mit verschiedener Ausgangsprotonierung sowohl vom K^+ -Salz als auch vom Mg^{2+} -Komplex des ATP untersucht. Die Ergebnisse von Kap. 3 und Kap. 4.2

⁺) In den folgenden Kapiteln wird zur Unterscheidung der Hydrolysegrad α in % und die Protonierung mit $n = 0$ bis 2 angegeben.

wurden zur Deutung der Spektren herangezogen:

I	$K_{4-n}H_nATP$	1,3 M	$0 \leq n \leq 2$	Kap. 4.3.2
II	$MgK_{2-n}H_nATP$	0,85 M	$0 \leq n \leq 2$	Kap. 4.3.8
III	$MgK_{2-n}H_nATP$	0,25 M	$0 \leq n \leq 2$	Kap. 4.3.8

4.3.1 Abhängigkeit des Hydrolysegrades von der Inkubationszeit

In Abb. 26a,b ist die Abhängigkeit des Hydrolysegrades von der Dauer der Inkubation bei 48°C bzw. 43°C für 1,3 M ATP- bzw. 0,85 M MgATP-Lösungen dargestellt. Daraus läßt

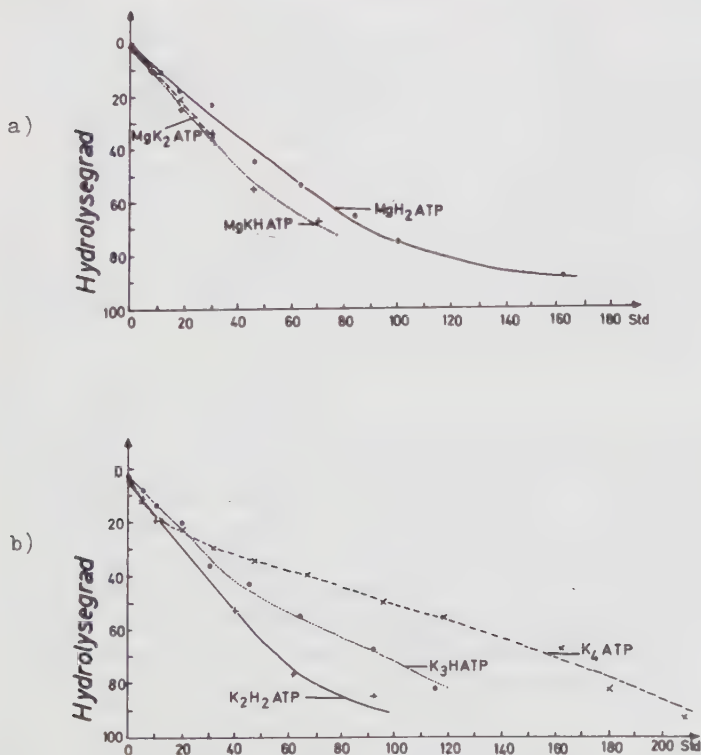


Abb. 26: Abhängigkeit des Hydrolysegrades von der Dauer der Inkubation

a) 1,3 M ATP-Lösungen (K_4ATP , K_2H_2ATP : 48°C, K_3HATP : 43°C)

b) 0,85 M MgATP-Lösungen (48°C)

sich folgendes entnehmen:

- 1) Die Zerfallsgeschwindigkeit ist abhängig von der Protonierung und der Mg^{2+} -Komplexbildung.
- 2) Das unprotonierte ATP-Molekül (K_4ATP) zerfällt bis ca. 20% Hydrolysegrad zunächst rasch, um dann langsamer zu hydrolysieren. Diese anfängliche raschere Spaltungsgeschwindigkeit ist korreliert mit dem exponentiellen Abfall des pH von 11,2 auf ca. 6,8 von 0 bis 20% Hydrolysegrad (s. Abb. 27a). Die Hydrolyse wird also im basischen Bereich etwas begünstigt ("Base-Katalyse") (106).
- 3) Beim K^+ -Salz des ATP ist die Zerfallsgeschwindigkeit für das einfach (K_3HATP) und das zweifach protonierte ($\text{K}_2\text{H}_2\text{ATP}$) Molekül größer als für das unprotonierte ATP. Die Protonen am endständigen Phosphat bewirken eine Umordnung der Elektronenstruktur. Die restlichen drei Valenzen werden nur noch auf zwei Bindungen mesomer verteilt. Wie die Tabelle 5 zeigt, ist die Vergrößerung der freien Enthalpie der Hydrolyse ΔG° um ca. 1 kcal/mol nur auf die starke Absenkung des Entropieterms ΔS° zurückzuführen. ΔH° nimmt durch die Protonierung sogar etwas ab.

	ΔG° (kcal/mol)	ΔH° (kcal/mol)	ΔS° (cal/°mol)
$\text{ATP}^{4-} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{ADP}^{3-} + \text{HPO}_4^{2-}$	-10,7	-4,4	+21
$\text{ATP}^{4-} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{ADP}^{3-} + \text{H}_2\text{PO}_4^-$	-10,8	-6,8	+13
$\text{ATPH}^{3-} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{ADPH}^{2-} + \text{H}_2\text{PO}_4^-$	- 9,9	-7,2	+ 9
$\text{H}^+\text{ATPH}^{3-} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{H}^+\text{ADPH}^{2-} + \text{H}_2\text{PO}_4^-$	- 9,3	-7,1	+ 7

Tabelle 5: Thermodynamische Größen für die Hydrolyse von ATP bei verschiedener Protonierung; 1 molal; 25°C, wäßrige Lösung, aus (7)

- 4) Beim Mg^{2+} -Komplex ist - im Gegensatz zu 3) - das zweifach protonierte Molekül am stabilsten. Ein rascherer Abfall am Anfang ist beim MgK_2ATP nicht zu beobachten, da der pH bereits ab wenigen Prozent Hydrolysegrad unter 7 liegt (s. Abb. 27b). Beim unprotonierten Molekül (K_4ATP) bewirkt das Ersetzen von 2 K^+ durch Mg^{2+} eine Beschleunigung des Zerfalls auf etwa das doppelte:

$$T_{1/2} (K_4ATP) = 80 \text{ Std. bei } 48^\circ C$$

$$T_{1/2} (MgK_2ATP) = 40 \text{ Std. bei } 48^\circ C$$

Die Komplexbildung mit Mg^{2+} an der unprotonierten Phosphatgruppe hat also eine lockernde Wirkung auf die Phosphodiesterbindung zwischen β - und γ -Phosphat. Eine Protonierung bewirkt eine Verdrängung des Mg^{2+} , wodurch die Anhydridbindung zwischen der α - und der β -Phosphatgruppe stabilisiert wird. Ein Vergleich der Bindungskonstanten für H^+ (pK_a) und Mg^{2+} ($\log K_{MgATP}$) zeigt dies ebenfalls deutlich (s. Tab. 1 und 4): Der $\log K_{MgATP}$ fällt von 4,22 auf 2,24 mit der Protonierung, und der pK_a wird von 6,50 auf 4,43 durch die Komplexbildung abgesenkt. Die Affinität der endständigen Phosphatgruppe zu H^+ ist also größer als zu Mg^{2+} , d. h. Protonenzugabe behindert die Mg^{2+} -Komplexbildung, allerdings nur an diesem einen Akzeptor. Ein Vergleich der zweifach protonierten Moleküle miteinander (K_2H_2ATP mit MgH_2ATP) zeigt, daß das komplexgebundene stabiler ist. Das Mg^{2+} bewirkt also bei der einfach protonierten Phosphatkette eine Stabilisierung im Gegensatz zum unprotonierten Molekül.

Die Ergebnisse sind in guter Übereinstimmung mit denen von Tetas und Loewenstein (8), die bei $pH = 9$ ($\hat{=}$ unprotoniertes Molekül) eine Verdopplung der Zerfallsgeschwindigkeit durch Mg^{2+} fanden im Gegensatz zu $pH = 5$ ($\hat{=}$ ca. einfach protoniert), bei dem das Mg^{2+} keinen merklichen Einfluß hat.

4.3.2 Abhängigkeit des pH vom Hydrolysegrad

Im vorigen Kapitel ist bereits eine Korrelation zwischen pH und Zerfallsgeschwindigkeit festgestellt worden. Ein Studium der pH-Abhängigkeit der Hydrolyse ergab folgende

Resultate (Abb. 27a,b) [†]):

- 1) Im Fall der unprotonierten Spezies $K_4\text{ATP}$ und $MgK_2\text{ATP}$ erfolgt am Beginn der Hydrolyse ein steiler, exponentieller Abfall, der in einen konstanten bzw. langsam abfallenden pH-Wert mündet. Dieser liegt im physiologischen pH-Bereich.
- 2) Ein konstanter bzw. nur wenig veränderlicher pH-Wert ist bei den einfach und zweifach protonierten Spezies bei allen Hydrolysegraden zu beobachten ("Puffersystem").

Bei bekanntem pK_a -Wert gibt der pH an, zu welchem Anteil ein Protonenakzeptor besetzt ist:

$$pH = pK_a + \log \frac{\alpha'}{1 - \alpha'} \quad \text{Gl. 20}$$

mit α' = Dissoziationsgrad

Beim Zerfall des ATP ergeben sich wechselnde Konzentrationsverhältnisse von ATP, ADP, ortho-Phosphat und Protonen. Die pK_a -Werte liegen zwischen 2 und 7 (s. Tab. 1), die pH-Werte ebenfalls. Der sich bei der Hydrolyse einstellende pH-Wert zeigt also an, wie sich die entstehenden Protonen auf die Akzeptoren verteilen. Außerdem kann man Aussagen darüber machen, welche Gruppen die stärksten Wasserstoff-Brücken-Akzeptor- bzw. -Donor-Eigenschaften haben. Wie in Kap. 4.2.2 ausgeführt, sind ja bei einem bestimmten pH-Wert diejenigen Atome die stärksten Wasserstoff-Brücken-Akzeptoren, deren pK_a -Wert nur wenig unter dem pH liegt, und die stärksten Wasserstoff-Brücken-Donoren diejenigen, deren pK_a -Wert nur wenig über diesem pH-Wert liegt.

[†]) Die durchschnittliche Konzentration von ATP im Gewebe, wo hohe ATPase-Aktivität herrscht (z. B. im Muskel), liegt bei 0,01 M (?). In den vorliegenden Messungen wurden viel höhere Konzentrationen verwendet. Bei einem Vergleich mit physiologischen Vorgängen muß man also diese Konzentrationsunterschiede sowie auch die niedrige Temperatur (10°C) berücksichtigen.

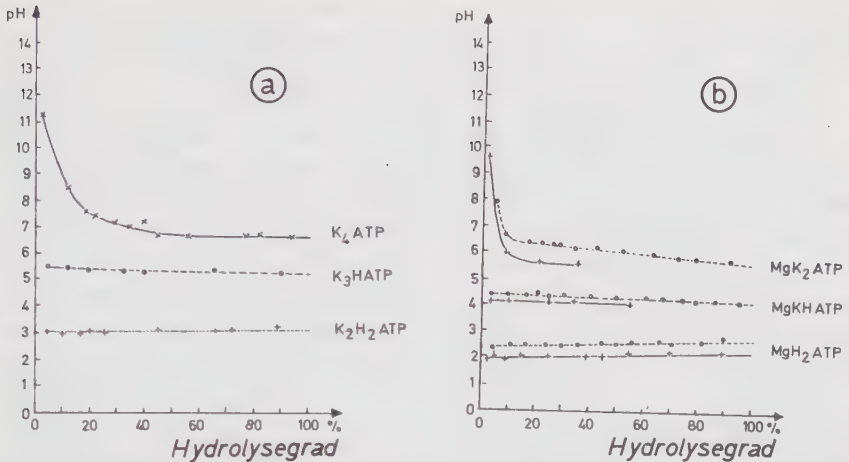


Abb. 27: Abhängigkeit des pH vom Hydrolysegrad für verschiedene Ausgangsprotonierungen

a) 1,3 M; $10^{\circ}C$

b) x-x-x 0,85 M; o-o-o 0,25 M; $10^{\circ}C$

In den folgenden Kapiteln wird an Hand der pH-Abhängigkeit der Hydrolyse bestimmt werden, welche Akzeptoren zu welchem Anteil protoniert bzw. deprotoniert sind. In Verbindung mit der Bandenanalyse im IR und der Änderungen des Spektrenuntergrundes läßt sich ein Bild darüber gewinnen, wo die Protonen angelagert werden und welche Wasserstoff-Brücken sich ausbilden.

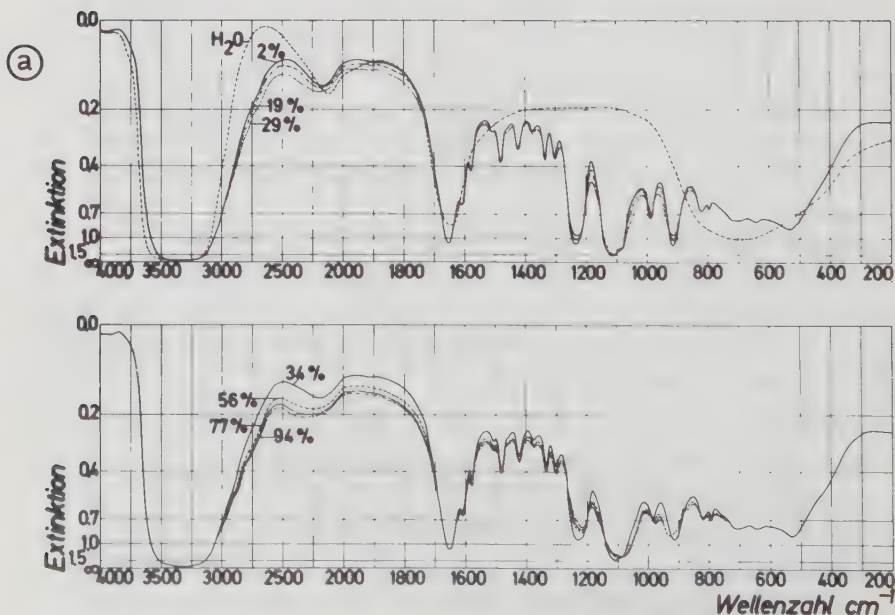
4.3.3 Die Hydrolyse von $K_{4-n}H_nATP$ in wäßriger Lösung

In diesem Kapitel werden die IR-Spektren von hydrolysierendem ATP behandelt und analysiert. Sie sind in der Abb. 28 dargestellt. Aus den Spektren lassen sich folgende Gemeinsamkeiten der drei Reihen herauslesen:

- 1) Veränderungen zeigen sich - neben der Untergrundextinktion - nur im Bereich der Phosphatbanden ($1300 - 800 \text{ cm}^{-1}$), nicht aber an den Adeninbanden ($1700 - 1300 \text{ cm}^{-1}$).
- 2) Die $\nu_{as} PO_2^-$ bei 1235 bzw. 1240 cm^{-1} verschiebt sich nach kleinen Wellenzahlen, die $\nu_{as} P-O-P$ von 915 cm^{-1} bzw. 905 cm^{-1} nach höheren Wellenzahlen (940 cm^{-1}). Beide nehmen in der Intensität gleichzeitig ab.

- 3) Die Banden bei ca. 2800 cm^{-1} und 2400 cm^{-1} nehmen mit dem Hydrolysegrad zu.

Aus dem 1. Punkt ergibt sich, daß der Protonenakzeptor am Basenring in den Hydrolysevorgang nicht mit einbezogen ist. Wenn er von Anfang an unprotoniert ist, so bleibt er auch unprotoniert während der Hydrolyse, entsprechend bleibt er protoniert beim $\text{K}_2\text{H}_2\text{ATP}$. Die Veränderungen der Banden in Punkt 2) sind charakteristisch für die Verschiebung des Hydrolysegleichgewichtes und zeigen die Bildung von ADP aus ATP an (vgl. Kap. 4.2.3 und 4.2.5 sowie Tab. 3). Aus den übrigen Phosphatbanden läßt sich auf die Bindungsplätze der freiwerdenden Protonen schließen. Die Bande bei 2800 cm^{-1} ist die OH-Valenzschwingung in der Wasserstoff-Brücke ($\text{POH}\cdots\text{OH}_2$) des anorganischen Phosphats, diejenige bei 2400 cm^{-1} die durch Fermiresonanz mit der νOH verstärkte 1. Oberschwingung der δOH in der H-Brücke (49) (50).



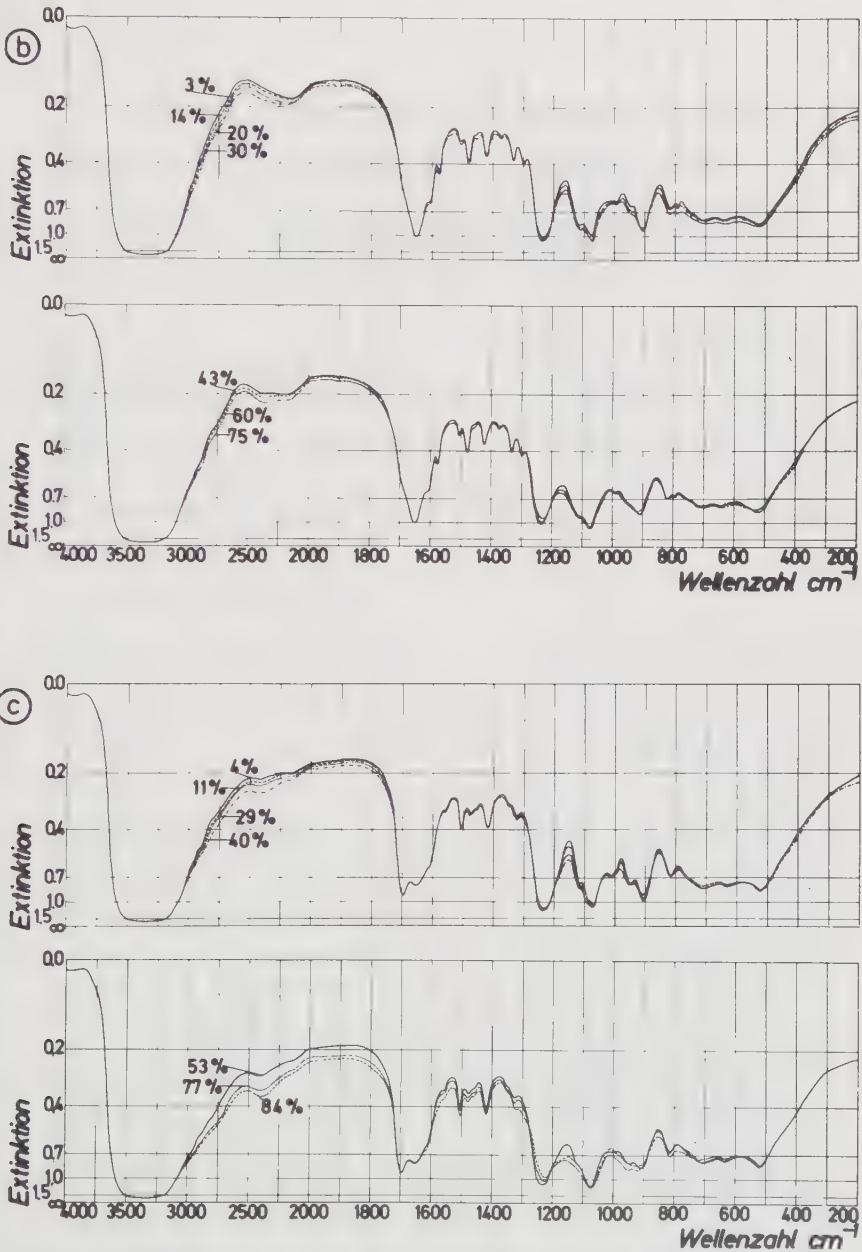


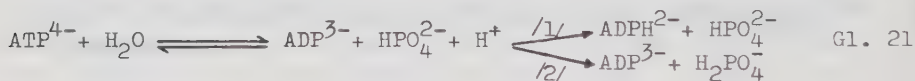
Abb. 28: IR-Spektren von ATP in Abhängigkeit vom Hydrolysegrad für verschiedene Ausgangsprotonierungen
 a) $n = 0$: K_4 ATP b) $n = 1$: K_3 HATP c) $n = 2$: K_2 H₂ATP
 1,3 M; Si-Küvette (Schichtdicke 12,1 μ m); 10°C;
 wässrige Lösung

4.3.3.1 $n = 0$ Ausgangsprotonierung (K_4 ATP)

Am interessantesten und biologisch wichtigsten sind die Vorgänge beim unprotonierten ATP-Molekül, denn bereits bei 20% Protonierung liegt der pH-Wert der wäßrigen Lösungen im physiologischen pH-Bereich (Kap. 4.2.1).

Die Banden (Abb. 28a, Tab. 6a)

In Tab. 6 sind sämtliche wichtige Veränderungen, die bei zunehmendem Hydrolysegrad im IR-Spektrum auftreten, zusammengefaßt. Bei der Hydrolyse des unprotonierten ATP wird das entstehende Proton (s. Gl. 2) entweder an der endständigen Phosphatgruppe des ADP /1/ oder am Hydrogenphosphat gebunden /2/:



Welcher Bindungsplatz bevorzugt ist, läßt sich aus den Banden entnehmen (Abb. 28a): Wenn /1/ stattfindet, müßte sich im Spektrum eine Überlagerung der Banden von 100% protonierten ADP und vom Hydrogenphosphat ergeben. Entsprechend müßte bei Bevorzugung von /2/ ein überlagertes Spektrum von 0% protoniertem ADP und H_2PO_4^- erscheinen (s. Tab. 6a). Man kann nun folgende Veränderungen an den Banden erkennen: Die antisymmetrische PO_3^{2-} -Schwingung bei 1118 cm^{-1} bzw. 1112 cm^{-1} ist charakteristisch für das unprotonierte ATP bzw. ADP und nimmt empfindlich mit der Protonierung ab (s. Kap. 4.2.3). Ihre Intensität ist beim ATP und ADP nahezu gleich (18). Wie die Abb. 28a zeigt, erfolgt mit der Hydrolyse eine teilweise Absenkung dieser Bande und gleichzeitig eine Verschiebung von 1118 cm^{-1} nach 1112 cm^{-1} . Es entsteht also sowohl unprotoniertes als auch protoniertes ADP. Die Bande bei 1085 cm^{-1} verschiebt sich nach 1080 cm^{-1} und wird intensiver. Da bei dieser Wellenzahl die Banden der $\nu_s \text{ PO}_2^-$ von ADP^{3-} , ADPH^{2-} und H_2PO_4^- , sowie der $\nu_{as} \text{ PO}_3^{2-}$ von HPO_4^{2-} liegen, ist keine Information über die Protonierung der Zerfallprodukte möglich. Die beiden Banden bei 1110 cm^{-1} und 1080 cm^{-1} verschmieren zu einer breiten Bande um 1100 cm^{-1} .

Banden	unhydrolysiert (2%)		hydrolysiert (94%): Zuordnung (Schwingung, Gruppierung)	
	ATP ⁴⁻		ADP	P _i
Phosphatgruppen	$\nu_{as} PO_2^-$	1235 s $\longrightarrow$ 1220 s 1160 sh	$\nu_{as} PO_2^-, ADP^{3-} + ADP^{2-}$	$\nu_{as} PO_2^-, H_2PO_4^-$
	$\nu_{as} PO_2^{2-}$	1118 s $\longrightarrow$ 1110 s	$\nu_{as} PO_3^{2-}$	
			$\left\{ \begin{array}{l} \nu_s PO_2^-, ADP^{3-} + ADP^{2-} \\ \nu_s PO_2^{2-}, ADP^{3-} \end{array} \right.$	$\nu_{as} PO_3^{2-}, HPO_4^{2-}$ $\nu_s PO_2^-, H_2PO_4^-$ $\nu_s PO_3^{2-}, HPO_4^{2-}$
	$\nu_s PO_2^-$	1085 sh $\longrightarrow$ 1080 s	$\nu P-(OH), ADP^{2-}$	$\nu_{as} P(OH)_2, H_2PO_4^-$
	$\nu_s PO_2^{2-}$	988 s $\longrightarrow$ 990 sh 975 m		
	$\nu_{as} P-O-P$	915 s $\longrightarrow$ 930 s	$\nu_{as} P-O-P, ADP^{3-} + ADP^{2-}$	$\nu P(OH), H_2PO_4^{2-}$
Adenin		870 w		
Untergrundextinktion	Adeninbanden werden nicht verändert: keine direkte Einbeziehung des Adeninringes bei der Hydrolyse.			
pH	Steigt an: linearer Anstieg (s. Tab. 6b) überlagert mit Maximum bei 50% Hydrolysegrad: leicht polarisierbare (POH...OP)-Brücken.			
	Zunächst exponentiell abfallend von 11,2 auf 6,8, dann konstant bleibend.			
Hydrolysegleichgewicht	$ATP^{4-} + H_2O \xrightleftharpoons{\text{Hydrolyse}} ADP^{3-} + HPO_4^{2-} + H^+$ $1 \xrightarrow{ADP^{2-} + HPO_4^{2-}}$ $2 \xrightarrow{ADP^{3-} + H_2PO_4^-}$ $\left. \begin{array}{l} \text{Proton etwa gleich verteilt} \\ \text{Verteilung der Protonen} \end{array} \right\}$			

Tab. 6b: K⁺-Salz; Ausgangsprotonierung n=1: Hydrolyse von K₃HATP (Abb. 28b)

Banden	ATPH ³⁻	unhydrolysiert (3%)	hydrolysiert (75%): Zuordnung (Schwingung, Gruppierung)
			P _i
Phosphatgruppen	$\nu_{as} PO_2$	1240 s $\longrightarrow$ 1225 s	$\nu_{as} PO_2, ADPH^{2-}$
		1160 sh	$\nu_{as} PO_2, H_2PO_4^-$
	$\nu_s PO_2^-$	1095 sh $\longrightarrow$ 1080 s	$\nu_s PO_2, ADPH^{2-}$
	1075 s		$\nu_s PO_2, H_2PO_4^-$
		945 m	$\nu_{as} P(OH)_2, H_2PO_4^-$
	$\nu_{as} P-O-P$	905 s $\longrightarrow$ 925 s	$\nu_{as} P-O-P, ADPH^{2-}$
Adenin	Adeninbanden verändern sich nicht mit Hydrolysegrad.		
Untergrundextinction	Steigt linear an: Bisher noch keine Deutung möglich, (POH...N)-Brücken?		
pH	Bleibt konstant mit dem Hydrolysegrad: pH = 5,4		
Hydrolysegleichgewicht	$ATPH^{3-} + H_2O \rightleftharpoons ADPH^{2-} + H_2PO_4^-$		

Tab. 6c: K⁺-Salz, Ausgangsprotonierung n=2: Hydrolyse von K₂H₂ATP (Abb. 28c)

Banden	unhydrolysiert (4%)	hydrolysiert (84%): Zuordnung (Schwingung, Gruppierung)
	H ⁺ ATPH ³⁻	ADP P _i
	$\nu_{as} PO_2^-$ 1240 s	1225 s $\nu_{as} PO_2^-, ADPH^{2-}$
		1160 m $\nu_{as} PO_2^-, H_2PO_4^-$
	$\nu_s PO_2^-$ 1095 sh } 1075 s }	1080 s $\left\{ \begin{array}{l} \nu_s PO_2^-, ADPH^{2-} \\ \nu_s PO_2^-, H_2PO_4^- \end{array} \right.$
		940 m $\nu_{as} P(OH)_2, H_2PO_4^-$
	$\nu_{as} P-O-P$ 905 s	925 m $\nu_{as} P-O-P, ADPH^{2-}$
Adenin	Keine Veränderungen an den Adeninbanden mit dem Hydrolysegrad	
Untergrundextinction	Steigt an: Bei 1400 cm ⁻¹ linearer Anstieg (s.Tab. 6b), bei 1900 cm ⁻¹ linearer Anstieg (s.Tab. 6b) überlagert mit zusätzlichem Anstieg mit Maximum bei ca. 100% Hydrolysegrad: leicht polarisierbare NH ... OP-Brücken mit etwas unsymmetrischem Potential.	
pH	Bleibt konstant: pH = 3,05	
Hydrolysegleichgewicht	$H^+ ATPH^{3-} + H_2O \rightleftharpoons H^+ ADPH^{2-} + H_2PO_4^-$	

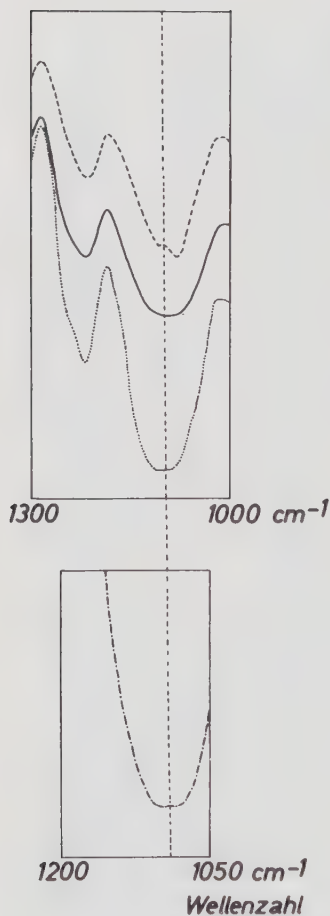


Abb. 29: Bereich der Phosphatbanden für das 94% hydrolysierte K_4ATP
 ----- 0,25 M
 ————— 1,3 M
 1,3 M 2-fache Ordinatenendehnung
 -.-.-.- 1,3 M 4-fache Ordinatenendehnung, 2-fache Abszissendehnung

Die Halbwertsbreite beträgt etwa 100 cm^{-1} . Sie ist in Abb. 29 nochmals extra mit Abszissen- und Ordinatenendehnung gezeichnet. Man sieht, daß es sich um zwei getrennte Banden handelt.

Bei Verdünnung ändert sich das Intensitätsverhältnis der beiden Banden zueinander. Die $\nu_{as}\text{ PO}_3^{2-}$ des ADP bei 1110 cm^{-1} wird schwächer im Vergleich zur Bande bei 1080 cm^{-1} . Das läßt darauf schließen, daß Assoziate zwischen den Zerfallsprodukten gebildet werden, die mit einer Verdünnung aufgebrochen werden. Dabei bleibt das Proton bevorzugt am ADP.

Zwischen 1100 cm^{-1} und 1200 cm^{-1} erfolgt eine Anhebung des Spektruntergrundes durch die antisymmetrische Valenzschwingung der PO_2^- -Gruppe des ortho-Phosphats. Die entsprechenden des ADP^{3-} bei 1215 cm^{-1} bzw. des ADPH^{2-} bei 1224 cm^{-1} verschmieren zu einer Bande bei 1220 cm^{-1} . Die Schulter bei 870 cm^{-1} wird durch die symmetrische P(OH)_2 -Valenzschwingung verursacht, während sich die antisymmetrische bei 945 cm^{-1} mit der ν_{as} der P-O-P-Gruppe des ADP überlagert. Die Banden des 200% protonierten ortho-Phosphats sind also gut zu erkennen, sind aber nicht sehr stark ausgeprägt. Vor allem auch die Bande bei 990 cm^{-1} der symme-

trischen PO_3^{2-} -Schwingung läßt darauf schließen, daß auch einfach protoniertes ADP und Hydrogen-Phosphat vorhanden sein muß.

Zusammenfassend ergibt sich aus der Bandenanalyse, daß das Proton auf ADP und P_i etwa gleich verteilt wird.

Die thermodynamischen Größen zeigen ein interessantes Verhalten (Tab. 5): Die freie Enthalpie ΔG° der Hydrolyse ist unabhängig von der Verteilung der Protonen auf die Zerfallsprodukte, dagegen differieren ΔH° und ΔS° stark. Sie ergänzen sich aber gegenseitig so, daß sich fast derselbe Wert für ΔG° ergibt. Für die Energiebilanz spielt das keine Rolle, wohl aber für die Vorgänge auf molekularer Ebene. Die Enthalpie ΔH° gibt in erster Linie Änderungen der Bindungsenergie an (54), während ΔS° sehr oft durch Änderung der Hydratstruktur beeinflusst wird (6). Korrelationen zwischen ΔH° und ΔS° treten in Systemen mit H-Brücken-Bindung auf (102) (103).

pH-Abhängigkeit

Bei der Untersuchung der Abhängigkeit des Hydrolysegrades vom pH (s. Kap. 4.3.2 und Abb. 27a) ergab sich, daß bei einer Ausgangsprotonierung $n = 0$ zunächst ein Abfall von 11,2 auf 6,8, dann ab ca. 30% Hydrolysegrad ein konstanter pH-Wert von 6,8 gemessen wird. Die basische Reaktion wird also zunächst durch die entstehenden Protonen und ihre Bindung an die PO_3^{2-} -Gruppen aufgehoben. Nach Smith und Alberty (51) liegen die pK_a -Werte der beteiligten Gruppen bei (s. auch Tab. 1):

	pK_a	μ (Ionenstärke)
$\text{ATP}^{3-} \rightleftharpoons \text{ATP}^{4-} + \text{H}^+$	6,95	0,2
$\text{ADP}^{2-} \rightleftharpoons \text{ADP}^{3-} + \text{H}^+$	6,88	0,2
$\text{H}_2\text{PO}_4^- \rightleftharpoons \text{HPO}_4^{2-} + \text{H}^+$	6,78	0,2

Sie liegen also alle beim gemessenen pH-Wert dicht beieinander.

Daraus folgt nach Gl.20, daß alle beteiligten Gruppierungen an der Protonierung beteiligt sind, wobei das ATP vor dem ADP und HPO_4^- etwas bevorzugt ist ⁺). Durch die hydrolytische Spaltung des ATP nimmt die Konzentration von ATP ab, während diejenige von ADP und P_i zunimmt. Bei $\alpha = 50\%$ haben alle beteiligten Spezies gleiche Konzentration:

$$[\text{ATP}] : [\text{ADP}] : [\text{HPO}_4^{2-}] : [\text{H}^+] = 1 : 1 : 1 : 1$$

Das Proton teilt sich auf die drei Akzeptoren etwa gleichmäßig auf.

Bei $\alpha = 100\%$ existiert kein ATP mehr in der Lösung, und es ergibt sich ein Verhältnis von

$$[\text{ADP}] : [\text{HPO}_4^{2-}] : [\text{H}^+] = 1 : 1 : 1$$

Das Proton teilt sich also auf das ADP und Hydrogenphosphat etwa zu gleichen Teilen auf. Es muß also sowohl unprotoniertes wie protoniertes ADP sowie Hydrogen- und Dihydrogenphosphat entstehen. Die Betrachtung der pK_a -Werte und der pH-Abhängigkeit bestätigt also das Ergebnis der Bandenanalyse.

Die Untergrundextinktion (Abb. 30a)

Der Verlauf der Untergrundextinktion mit dem Hydrolysegrad ist in Abb. 30a dargestellt. Sowohl bei 1900 cm^{-1} als auch bei 1400 cm^{-1} ist ein Anstieg zu beobachten.

Im vorigen Abschnitt konnten wir feststellen, daß alle beteiligten Gruppen teilweise protoniert werden. Die unprotonierten Gruppen sind dann die stärksten Wasserstoff-Brücken-Akzeptoren, während die protonierten die stärksten -Donoren sind.

⁺) Der Unterschied von 1,3 M gegenüber 1,0 M Lösungen, für die die Beziehung exakt gilt, ist nur gering, wie man am Ostwaldschen Verdünnungsgesetz sieht.

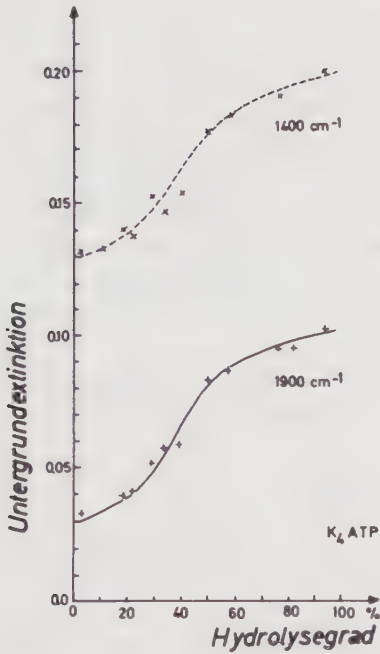
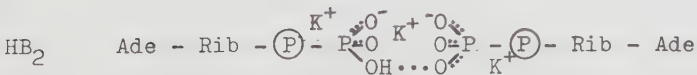
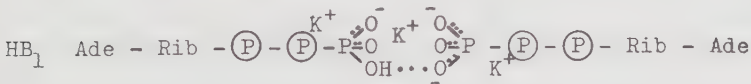


Abb. 30a: Verlauf der Untergrundextinktion bei 1900 cm^{-1} und 1400 cm^{-1} für $1,3\text{ M K}_4\text{ATP}$ in Abhängigkeit vom Hydrolysegrad

Wie die folgende Betrachtung zeigen wird, sind bei $n=0$ im Gegensatz zu $n=1$ bereits von Anfang an auch Wasserstoff-Brücken (HB_i mit symmetrischem Potential möglich, die den Anstieg mit dem Hydrolysegrad bewirken können. Es sind dies einmal die H-Brücken zwischen gleichen Molekülen (Dimere) [†]):

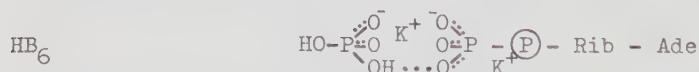
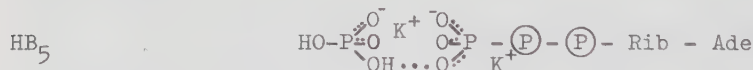
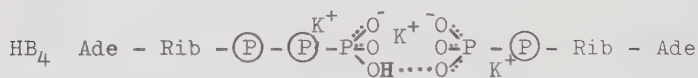


[†]) Bei allen H-Brücken ist nur jeweils eine Grenzstruktur dargestellt. Ebenso sind auch die H-Brücken möglich, bei denen sich das Proton am anderen Akzeptor befindet.



Alle haben einen $\Delta pK_a = 0$. Für die Brücken HB_1 (s. Kap. 4.2.4) und HB_3 (s. Kap. 3.2) konnte gezeigt werden, daß sie leicht polarisierbar sind und eine kontinuierliche Absorption im IR bewirken, während für die Brücken HB_2 dieser Nachweis bei den maximal erreichbaren Konzentrationen offenbleiben mußte (s. Kap. 4.2.6).

Außerdem sind H-Brücken zwischen verschiedenartigen Molekülen möglich:



Der ΔpK_a für solche Brücken liegt zwischen 0,10 und 0,17. Sie haben also ein im zeitlichen Mittel fast symmetrisches Potential und sind deshalb leicht polarisierbar. Alle Wasserstoff-Brücken HB_1 , H_3 - HB_6 tragen also zum Maximum der Kontinuumsabsorption bei 50% Hydrolysegrad bei.

Von $\alpha = 50\%$ bis 100% steigt die Untergrundextinktion schwächer an. Bei $\alpha = 100\%$ sind ADP^{3-} und HPO_4^{2-} etwa halbprotoniert. Zwischen diesen können Wasserstoff-Brücken der Art HB_2 , HB_3 und HB_6 gebildet werden. (Für Brücke HB_2 siehe oben). Die beiden übrigen Brücken haben einen ΔpK_a von 0 bzw. 0,1. Sie haben also einen annähernd symmetrischen Potentialverlauf.

Zusammenfassend ergibt sich, daß zwischen fast allen beteiligten Spezies leicht polarisierbare Wasserstoff-Brücken der Art $(\text{POH} \cdots \text{OP})^-$ geknüpft werden. Vor allem die H-Brücken, die vom ATP gebildet werden, erreichen bei $\alpha = 50\%$ ihre maximale Konzentration und bewirken eine besonders intensive Anhebung des Untergrundes.

Diesen Anhebungen des Spektrenuntergrundes ist ein linearer Anstieg überlagert, der bei allen Ausgangsprotonierungen auftritt und im nächsten Kapitel diskutiert wird.

4.3.3.2 $r = 1$, Ausgangsprotonierung (K_3HATP) (Tab. 6b)

Das einfach protonierte K^+ -Salz des ATP kristallisierte ab einem Hydrolysegrad von ca. 75% aus. Den Spektren der Abb. 32b kann man folgendes entnehmen:

Die Banden (Abb. 28b)

Am ATP sitzt bereits ein Proton, bevor das Molekül hydrolysiert. Dadurch sind auch nur die Banden der protonierten, endständigen Phosphatgruppe zu erkennen (s. Kap. 4.2.4.3), die auch bei zunehmendem Hydrolysegrad erhalten bleiben. Daraus folgt, daß die endständige Phosphatgruppe des ADP protoniert bleibt. Daneben erkennt man auch die anderen Banden des einfach protonierten ADP (s. Tab. 6b). Die $\nu_{\text{as}} \text{P}(\text{OH})_2$ bei 945 cm^{-1} , die $\nu_{\text{s}} \text{PO}_2^-$ bei 1080 cm^{-1} und die $\nu_{\text{as}} \text{PO}_2^-$ des Dihydrogenphosphats bei 1160 cm^{-1} nehmen mit der Hydrolyse zu. Demnach erfolgt die Hydrolyse des K_3HATP nach der Gleichung:



Eine Veränderung an den Adeninbanden ist nicht zu beobachten. Der Basenrest wird also bis zu dem gemessenen Hydrolysegrad nicht mit in das Gleichgewicht einbezogen.

pH-Abhängigkeit

Es wird über den gesamten untersuchten Hydrolysegradbereich ein pH von 5,4 gemessen. Die Phosphatgruppen ($pK_a \approx 6,8$) sind also im Gegensatz zu $n=0$ voll protoniert. Außer den schon im vorigen Kapitel aufgezählten pK_a -Werten der Phosphatgruppen im Bereich um 6,8 gibt es folgende darunterliegende pK_a -Werte (88) (89) (48):

	pK_a	μ
$H^+ATP^{3-} \rightleftharpoons ATPH^{3-} + H^+$	4,06	0,1
$H^+ADPH^{2-} \rightleftharpoons ADPH^3 + H^+$	3,95	0,1
$H_3PO_4 \rightleftharpoons H_2PO_4^- + H^+$	2,1	0,2

Bei einem pH von 5,4 sind diese Akzeptoren nur zu einem ganz geringen Teil protoniert. Das gleiche gilt für die übrigen Akzeptoren an den O-Atomen der Phosphatgruppen von ATP und ADP, deren $pK_a \leq 2$ sind. Die Hydrolyse findet also stark bevorzugt nach der Gl.22 statt, was das Ergebnis der Bandenanalyse unterstützt. Während die protonierten Phosphatgruppen die stärksten Wasserstoff-Brücken-Donoren sind, ist der N_1 -Stickstoff des Basenrestes der stärkste Wasserstoff-Brücken-Akzeptor.

Die Untergrundextinktion (Abb. 30b)

Der Spektrenuntergrund steigt sowohl bei 1900 cm^{-1} als auch bei 1400 cm^{-1} linear mit dem Hydrolysegrad an [†]). Wasserstoff-Brücken mit symmetrischen oder nahezu symmetrischem Potential, wie sie sich bei $n=0$ und $n=2$ bilden und eine kontinuierlich Absorption bewirken, können bei $n=1$ nicht auftreten.

[†]) Eine wesentliche Fehlerquelle, die bei quantitativen IR-Messungen auftritt, konnte ausgeschlossen werden: Die Messungen zeigen, daß Oberschwingungen im Bereich um 4000 cm^{-1} mit zunehmendem Hydrolysegrad nicht auftreten. Der Anfangs- und Bezugspunkt der Spektren bei 4000 cm^{-1} bleibt also während einer Meßreihe unveränderlich.

Nur die Wasserstoff-Brücken zwischen den POH-Gruppen des ADP oder P_i und dem N_1 des Adenins haben noch ein relativ

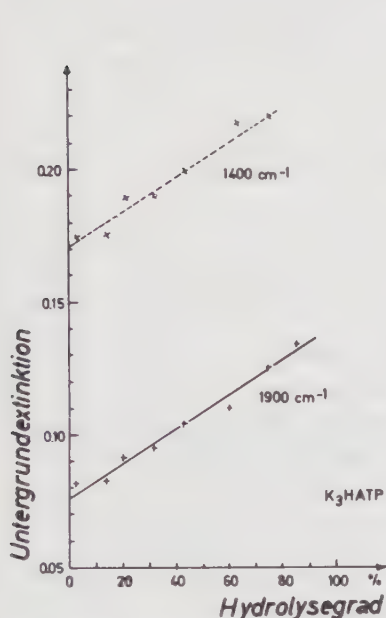


Abb. 30b: Verlauf der Untergrundextinktion bei 1900 cm^{-1} und 1400 cm^{-1} für $1,3\text{ M K}_3\text{HATP}$ in Abhängigkeit vom Hydrolysegrad

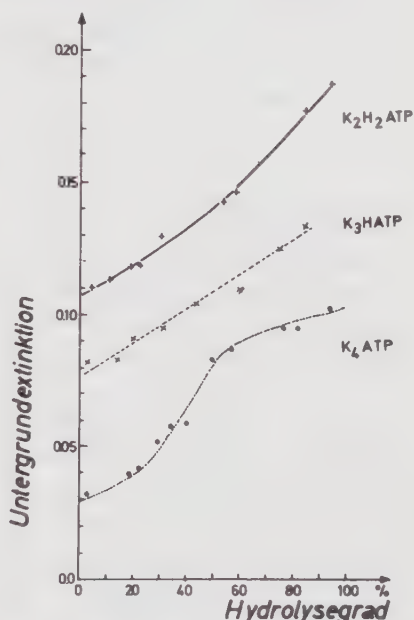


Abb. 30c: Vergleich des Anstiegs der Untergrundextinktion bei 1900 cm^{-1} für drei verschiedene Ausgangsprotonierungen des ATP

symmetrisches Potential ($\Delta pK_a = 2,8$), so daß sie leicht polarisierbar sein können. Sie sollten aber keine Veränderungen des Untergrundes bei 1400 cm^{-1} bewirken (s. Kap. 4.2.4.4), so daß diese Brücken als Ursache des Anstiegs wenig plausibel erscheinen (siehe auch Kap. 4.3.4.3).

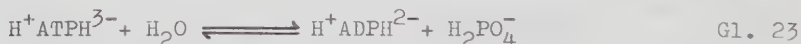
Mit zunehmendem Hydrolysegrad nimmt die Konzentration an Dihydrogen-Phosphat bzw. Hydrogen-Phosphat zu. Anhebungen des Spektrenuntergrundes bei 1900 cm^{-1} und 1400 cm^{-1} , die nicht von leicht polarisierbaren Wasserstoff-Brücken herrühren können, sind von Schiöberg (16) (45) an Hydrogen- und Dihydrogen-Phosphat gemessen worden. Sie liegen in der gleichen Größenordnung

und sind klein gegenüber den im allgemeinen beobachteten Veränderungen des Spektrenuntergrundes durch polarisierbare Wasserstoff-Brücken (11) (12), so daß ihnen bisher keine Beachtung geschenkt worden ist. Es ist deshalb auch noch keine Erklärung für diesen Effekt bekannt, so daß auch hier eine Deutung offenbleiben muß.

4.3.3.3 $n = 2$ Ausgangsprotonierung (K_2H_2ATP)

Die Banden (Abb. 28c, Tab. 6c)

Zusätzlich zu der Ausgangsprotonierung am endständigen Phosphat tritt beim K_2H_2ATP die N_1 -Protonierung des Adenins. Sie wird durch die Banden bei 1695 cm^{-1} und 1510 cm^{-1} angezeigt, die sich mit fortschreitendem Hydrolysegrad nicht ändern. Das 2. Proton bleibt also am Adeninring. Das schließt natürlich eine Wechselwirkung über Wasserstoff-Brücken nicht aus. Die Veränderungen an den Phosphatbanden entsprechen denen beim K_3HATP . Die Bande der antisymmetrischen Valenzschwingung des $H_2PO_4^-$ bei 1160 cm^{-1} ist bei höheren Hydrolysegraden gut zu erkennen. Es findet also bevorzugt folgende Reaktion statt:



Die Tabelle 5 zeigt, daß die ΔH° -Werte für die Hydrolyse von K_3HATP und K_2H_2ATP fast identisch sind (7,2 bzw. 7,1 kcal/mol), während der Entropie-Term für das am Basenrest protonierte ATP etwas geringer ist (9 bzw. 7 cal/mol grad).

pH-Abhängigkeit

Der pH von 3,05 ändert sich mit der Hydrolyse nicht. Über diesem pH-Wert liegt der pK_a der Protonierung am N_1 -Stickstoff, darunter die pK_a -Werte der restlichen O-Atome der Phosphatkette (≤ 2) und der letzte pK_a des ortho-Phosphats (2,1). Der Basenrest ist also zu ca. 90% protoniert, während die übrigen Protonenakzeptoren nur wenig protoniert sind. Diese sind also auch starke Wasserstoff-Brücken-Akzeptoren, während die $-N_1H$ -Gruppe ein starker -Donor ist.

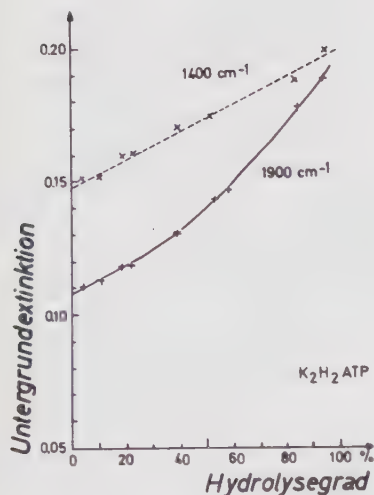


Abb. 30d: Verlauf der Untergrundextinktion bei 1900 cm⁻¹ und 1400 cm⁻¹ für 1,3 M K₂H₂ATP in Abhängigkeit vom Hydrolysegrad

Die Untergrundextinktion (Abb. 30d)

Auch bei $n=2$ ist ein linearer Anstieg der Untergrundextinktion bei 1900 und 1400 cm⁻¹ zu beobachten (Abb. 30d). Er wurde bereits im vorhergehenden Kapitel diskutiert. Zusätzlich überlagert ist bei 1900 cm⁻¹ eine etwas stärkere Anhebung des Spektrenuntergrundes. Sie ist auf etwas unsymmetrische, aber noch leicht polarisierbare Wasserstoff-Brücken zurückzuführen, die zwischen dem protonierten N₁-Stickstoff und einem Phosphat-O-Atom ($\Delta pK_a = 2,78$) eines Nachbarmoleküls geknüpft werden. Solche NH⁺...O-Brücken konnten beim ATP und ADP nachgewiesen werden (Kap. 4.2.6.2. und 4.2.6.5). Sie haben eine stabilisierende Wirkung auf das "stacking" der Basenreste (101).

4.3.4 Die Hydrolyse von MgK_{2-n}H_nATP in wäßriger Lösung

Die Hydrolyse des Mg-Komplexes von ATP wurde in zwei Reihen, eine mit niedriger Konzentration (0,25 M) und eine mit höherer Konzentration (0,85 M) untersucht. Gemeinsam war bei den Reihen die Ausgangsprotonierung von 0, 100 und 200%. Zusätzlich wurden noch Reihen mit 50% und 150% Ausgangsprotonierung in 0,25 M wäßriger Lösung untersucht (Abb. 31, 32). Wie schon in Kap. 4.2.3 erwähnt, wurden die Spektren mit der geringeren Konzentration wegen der besseren Genauigkeit mit 2-facher Ordinaten-Dehnung aufgenommen.

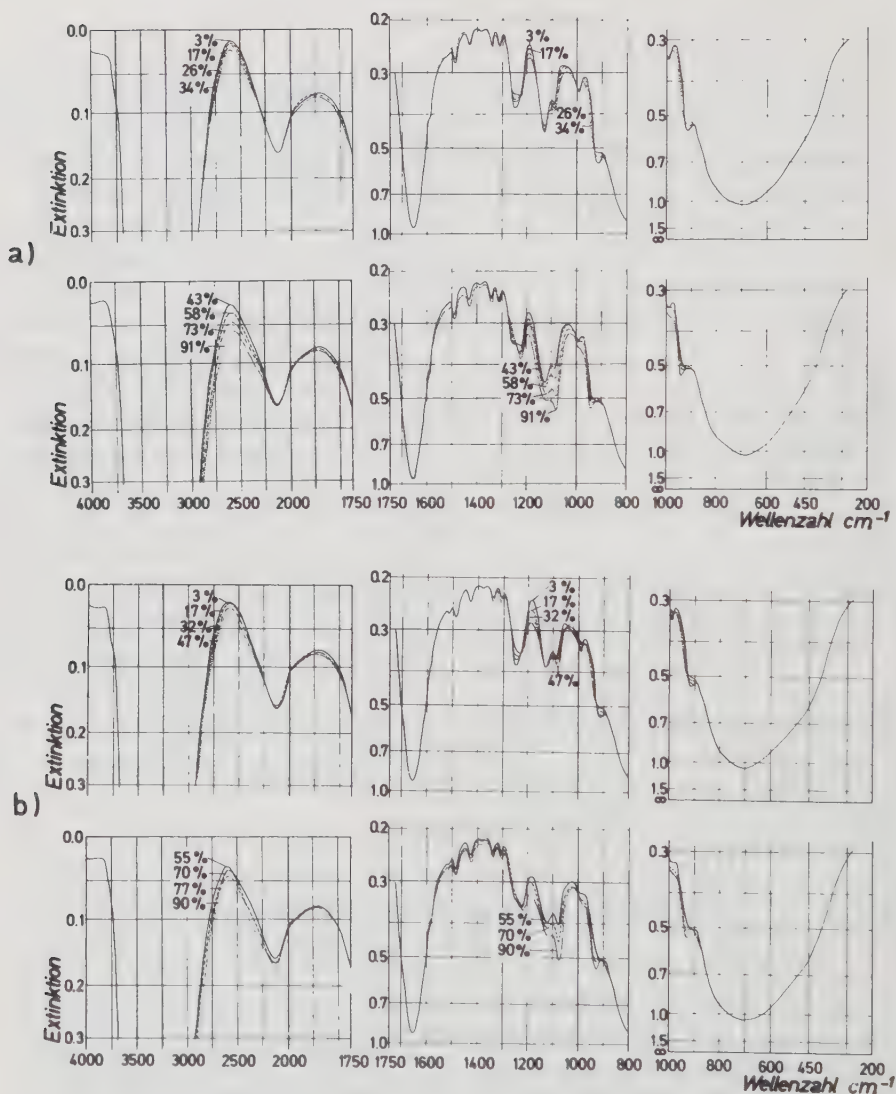


Abb. 31: IR-Spektren von MgATP in Abhängigkeit vom Hydrolysegrad für verschiedene Ausgangsprotonierungen

0,25 M; Si-Küvette (Schichtdicke 12,1 μm); 10°C; wäßrige Lösung

a) $n = 0$; MgK_2ATP b) $n = 0,5$; $\text{MgK}_{1,5}\text{H}_0,5\text{ATP}$

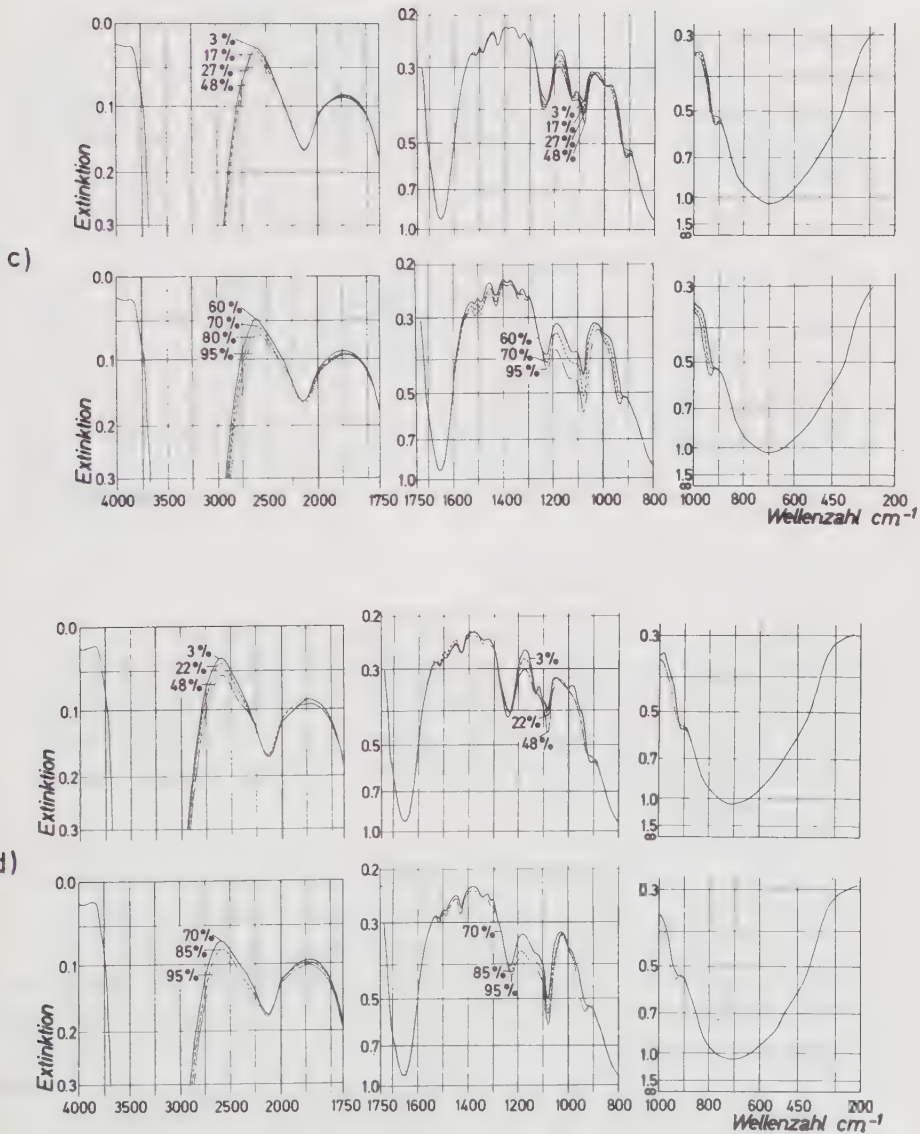


Abb. 31: c) $n = 1,0$: MgKHATP d) $n = 1,5$: $\text{MgK}_{0,5}\text{H}_{1,5}\text{ATP}$

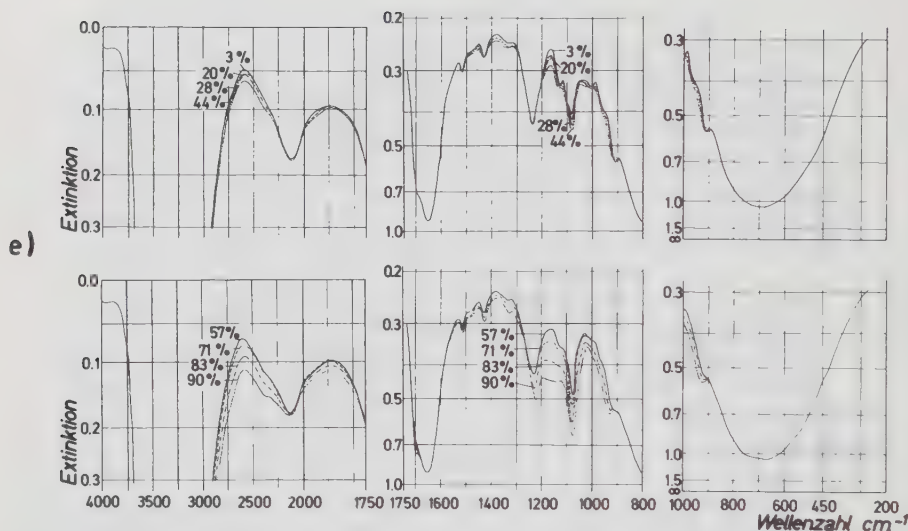


Abb. 31: e) $n = 2$: MgH_2ATP

Die Zerfallsprodukte der Hydrolyse von MgK_2ATP und MgKHATP hatten eine geringere Löslichkeit als die Ausgangsprodukte und fielen mit zunehmendem Hydrolysegrad aus. So konnte die Reihe von 0,85 M MgK_2ATP -Lösung nur bis 35% Hydrolysegrad und die Reihe 0,85 M MgKHATP -Lösung nur bis 66% Hydrolysegrad verfolgt werden.

Aus den Spektren der 0,25 M Lösungen kann man für alle Ausgangsprotonierungen folgendes entnehmen: Die Verschiebung der Bande der $\nu_{\text{as}} \text{PO}_3^{2-}$ von 1243 cm^{-1} nach 1214 cm^{-1} und der $\nu_{\text{as}} \text{P-O-P}$ von 905 cm^{-1} nach 930 cm^{-1} zeigt den Zerfall von MgATP in MgADP an. Es ist nicht von vornherein selbstverständlich, daß das Mg^{2+} am ADP gebunden wird. Die bevorzugten Bindungsplätze für das Mg^{2+} liegen beim ATP am β - und γ -Phosphat, beim ADP am α - und β -Phosphat. Es muß also eine Umordnung stattfinden. Die Tabelle 3 zeigt, daß die Bindung von Mg^{2+} an das ortho-Phosphat durchaus nicht zu vernachlässigen ist. Sie ist aber geringer als die Bindungskonstante des Mg^{2+} an das ADP.

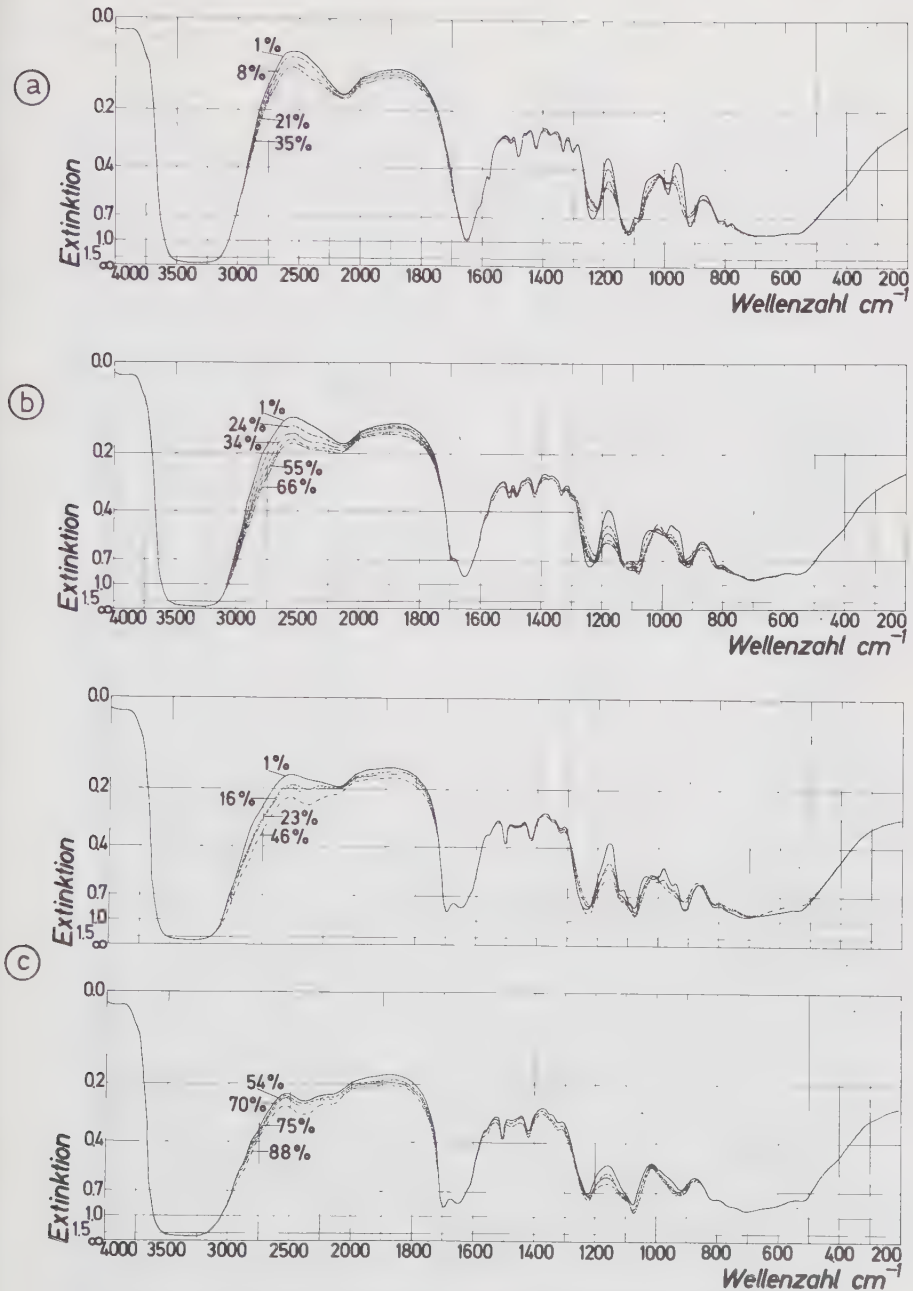


Abb. 32: IR-Spektren von MgATP in Abhängigkeit vom Hydrolysegrad für verschiedene Ausgangsprotonierungen; 0,85 M Si-Küvette (Schichtdicke 12,1 μm); 10°C; wäßrige Lösung
 a) $n = 0$: MgK_2ATP b) $n = 1$: MgKHATP c) $n = 2$: MgH_2ATP

Tab. 7a: Mg^{2+} -Komplex, Ausgangsprotonierung $n=0$: Hydrolyse von MgK_2ATP (Abb. 31a u. 32a)

Banden	unhydrolysiert (1%)	hydrolysiert (91%) Zuordnung (Schwingung, Gruppierung)
	MgATP^{2-}	MgADP P_i
Phosphatgruppen	$\nu_{\text{as}} \text{PO}_2^-$ 1243 s $\longrightarrow$ 1214 s	$\nu_{\text{as}} \text{PO}_2^-, \text{MgADP}^-$
		1160 sh
	$\nu_{\text{as}} \text{PO}_3^{2-}$ 1125 s $\longrightarrow$ 1118 sh	$\nu_{\text{as}} \text{PO}_3^{2-}, \text{MgADP}^-$
		$\left\{ \begin{array}{l} \nu_{\text{s}} \text{PO}_2^- \left\{ \begin{array}{l} \text{MgADP}^- \\ \text{MgADPH} \end{array} \right. \end{array} \right.$
	$\nu_{\text{s}} \text{PO}_2^-$ 1090 m $\longrightarrow$ 1080 s	$\nu_{\text{s}} \text{PO}_2^-, \text{H}_2\text{PO}_4^-$
		$\nu_{\text{as}} \text{PO}_3^{2-}, \text{HPO}_4^{2-}$
	$\nu_{\text{s}} \text{PO}_3^{2-}$ 988 m $\longrightarrow$ 1000 sh	$\nu_{\text{s}} \text{PO}_3^{2-}, \text{MgADP}^-$
		945 m
	$\nu_{\text{as}} \text{P-O-P}$ 905 s $\longrightarrow$ 930 s	$\nu_{\text{as}} \text{P-O-P}, \text{MgADP}^-$
Adenin	Keine Veränderungen an den Adeninbanden.	
Untergrundextinktion	Nur bis 35% Hydrolysegrad zu verfolgen (kristallisiert aus): Bei 1400 cm^{-1} fast konstant, bei 1900 cm^{-1} linearer Anstieg (s. Tab. 7b).	
pH	0,85 M: Zunächst rasch abfallend von 9,6 auf 5,6. 0,25 M: Zunächst rasch abfallend von 7,9 auf 6,3, dann langsam auf 5,8.	
Hydrolysegleichgewicht	$\text{MgATP}^{2-} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{MgADP}^- + \text{H}_2\text{PO}_4^-$ stark bevorzugt	

Tab. 7b: Mg^{2+} -Komplex: Ausgangsprotonierung n=1: Hydrolyse von MgHATP (Abb. 31b, 32b)

banden	unhydrolysiert (1%)	hydrolysiert (95%): Zuordnung (Schwingung, Gruppierung)
	MgHATP^-	MgADP P_i
Phosphatgruppen	$\nu_{\text{as}} \text{PO}_2^-$ 1240 s	$\longrightarrow$ 1220 s $\nu_{\text{as}} \text{PO}_2^- \text{MgADPH}$
		1160 sh
	$\nu_{\text{as}} \text{PO}_3^{2-}$ 1110 m	$\longrightarrow$ 1110 m $\nu_{\text{as}} \text{PO}_3^{2-}, \text{MgADP}^-$
		$\left\{ \begin{array}{l} \nu_{\text{s}} \text{PO}_2^- \text{MgADPH} \\ \nu_{\text{s}} \text{PO}_2^-, \text{H}_2\text{PO}_4^- \\ \nu_{\text{as}} \text{PO}_3^-, \text{HPO}_4^{2-} \end{array} \right.$
	$\nu_{\text{s}} \text{PO}_2^-$ 1080 m	$\longrightarrow$ 1080 s
	$\nu_{\text{s}} \text{PO}_3^{2-}$ 1000 w	$\longrightarrow$ 980 m $\nu_{\text{P}}-\text{(OH)} \text{MgADPH} (?)$
	$\nu_{\text{as}} \text{P-O-P}$ 905 m	$\longrightarrow$ 940 m $\left\{ \begin{array}{l} \nu_{\text{as}} \text{P-O-P}, \text{MgADPH} \\ \nu_{\text{as}} \text{P(OH)}_2, \text{H}_2\text{PO}_4^- \end{array} \right.$
Adenin	Keine Veränderungen an Adeninbanden mit dem Hydrolysegrad (bleibt ca. halbprotoniert).	
Untergrundextinktion	Steigt linear an: Bisher noch keine Deutung möglich. ($\text{POH} \cdots \text{OP}$)-Brücken?	
pH	0,85 M: pH = const = 4,1 0,125 M: pH = const = 4,4	
Hydrolysegleichgewicht	$\text{MgHATP}^- + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{MgHADP} + \text{H}_2\text{PO}_4^-$	

Tab. 7c: Mg^{2+} -Komplex: Ausgangsprotonierung $n=2$, Hydrolyse von MgH_2ATP (Abb. 31c, 32c)

Banden	unhydrolysiert (3%)		hydrolysiert (90%) Zuordnung (Schwingung, Gruppierung)	
	MgH_2ATP		$MgADP$	
				P_i
	$\nu_{as} PO_2^-$	1240 s $\longrightarrow$ 1220 s 1160 m, br	$\nu_{as} PO_2^-, MgHADP$	$\nu_{as} PO_2^-, H_2PO_4^-$
	ν_{C-O} (Ribose)	1122 w $\longrightarrow$ 1120 sh	$\nu_{C-O, MgHADP}$ (Ribose)	
	$\nu_s PO_2^-$	$\left\{ \begin{array}{l} 1100 \text{ sh} \\ 1080 \text{ s} \end{array} \right\} \longrightarrow 1080 \text{ s}$	$\left\{ \begin{array}{l} \nu_s PO_2^-, MgHADP \\ \nu_{as} P-O-P, MgHADP \end{array} \right\}$	$\nu_s PO_2^-, H_2PO_4^-$ $\nu_{as} P(OH)_2, H_2PO_4^-$
Adenin	Keine Veränderungen an Adeninbanden mit dem Hydrolysegrad (bleibt protoniert).			
Untergrundextinktion	Steigt an: Bei 1400 cm^{-1} und 1900 cm^{-1} linearer Anstieg (s.Tab. 7b), bei 1900 cm^{-1} zusätzlich überlagert mit Maximum bei ca. 100% Hydrolysegrad: leicht polarisierbare $NH^+ \dots O$ -Brücken mit etwas unsymmetrischem Potential.			
pH	0,85 M: langsam ansteigend von 1,9 auf 2,3 0,25 M: langsam ansteigend von 2,3 auf 2,7			
Hydrolysegleichgewicht	$MgH_2ATP + H_2O \rightleftharpoons MgH_2ADP^+ + H_2PO_4^-$			

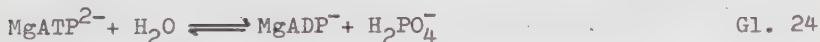
4.3. 4.1 n=0 Ausgangsprotonierung (MgK₂ATP) (Tab. 7a)

In der Tabelle 7a sind sämtliche wichtige Veränderungen, die bei zunehmendem Hydrolysegrad im IR-Spektrum auftreten, zusammengefaßt.

Die Banden (Abb. 31a, 32a)

Die Veränderungen an den Phosphatbanden sind sehr deutlich zu erkennen. Die antisymmetrische Schwingung der PO_2^- -Gruppe des MgATP bei 1243 cm^{-1} nimmt mit der Hydrolyse ab, während diejenige des MgADP bei 1214 cm^{-1} zunimmt. Die beiden Banden sind gut voneinander zu trennen. Die Bande der $\nu_{\text{as}}-\text{PO}_3^{2-}$ bei 1125 cm^{-1} wird anfänglich etwas abgesenkt. Mit dem Anwachsen der $\nu_{\text{s}}\text{PO}_2^-$ -Bande des ortho-Phosphats wird sie mit angehoben. Die symmetrische PO_3^{2-} -Schwingung, die beim MgATP $^{2-}$ bei 988 cm^{-1} liegt, erscheint beim hydrolysierten MgATP $^{2-}$ als schwache Schulter bei 1000 cm^{-1} ($\nu_{\text{as}}\text{PO}_3^{2-}$ des MgADP $^-$). Die Banden des Adenins werden nicht beeinflusst durch die Hydrolyse. Der N_1 -Stickstoff bleibt also unprotoniert.

Insgesamt ergibt sich also folgendes Bild: Die Banden des unprotonierten MgADP sind deutlich zu erkennen. Besonders wichtig ist, daß die Bande der antisymmetrischen Schwingung der endständigen PO_3^{2-} -Gruppe erhalten bleibt, also keine Protonierung eintritt. Die Bande bei 1080 cm^{-1} ist eine Überlagerung der $\nu_{\text{s}}\text{PO}_2^-$ des MgADP und des H_2PO_4^- . Die entsprechende antisymmetrische Schwingung des H_2PO_4^- bewirkt eine Anhebung um 1160 cm^{-1} . Das zweite freigesetzte Proton bindet also am Phosphat und nicht am MgADP:



Die endständige, zweifach-negativ geladene Phosphatgruppe bleibt also erhalten und damit auch die Bindung des Mg^{2+} an das ADP. Dieser Befund spielt eine Rolle für

- 1) die Konformation des MgADP-Moleküls und damit möglicherweise den enzymatischen Prozeß (54),

2) die elektrischen (Ladungszustand, Dipol, elektrostatische Abstoßung) (6) und chemischen Eigenschaften (Bindung von Kationen: Protonen, Pufferwirkung) (52).

pH-Abhängigkeit (Abb. 27b)

Wie beim $K_4\text{ATP}$ fällt auch beim MgK_2ATP der pH zunächst rasch ab. Er bleibt dann ab einem Hydrolysegrad von 15% aber nicht konstant, sondern nimmt langsam von 6,3 auf 5,8 ab. Das liegt daran, daß der pK_a der endständigen Phosphatgruppe des ADP nicht mehr bei 6,88 liegt, sondern im Mg^{2+} komplex gebundenen ADP bei 4,7. Das Proton wird also primär am Hydrogenphosphat ($\text{pK}_a = 6,7$) gebunden, zu einem ganz geringen Teil wird aber auch das MgADP protoniert.

Starke Wasserstoff-Brücken-Donoren sind also die H_2PO_4^- -Moleküle, während die Phosphatgruppen und der Adeninring des ADP ($\text{pK}_a = 4,0$) starke Wasserstoff-Brücken-Akzeptoren sind.

Die Untergrundextinktion (Abb. 33a)

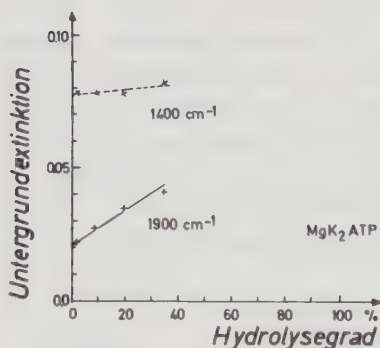


Abb. 33a: Verlauf der Untergrundextinktion bei 1900 cm^{-1} und 1400 cm^{-1} für $0,85\text{ M}$ MgK_2ATP in Abhängigkeit vom Hydrolysegrad

Wegen der mangelnden Löslichkeit (s. Kap. 4.3.8) der Zerfallsprodukte des MgK_2ATP konnte die Untergrundextinktion leider nur bis ca. 35% Hydrolysegrad verfolgt werden. Man beobachtet einen schwach linearen Anstieg bei 1400 cm^{-1} und einen steileren bei 1900 cm^{-1} .

Im biologischen Geschehen tritt das ATP^{4-} mit Mg^{2+} als Komplex auf (s. Kap. 4.2.7). Es soll deshalb im folgenden diskutiert werden, welche H-Brücken sich bilden können und welches Potential zu erwarten ist.

Durch die Mg^{2+} -Komplexbildung bleibt ja die endständige Phosphatgruppe unprotoniert. Es entsteht also MgADP und H_2PO_4^- . Zwischen diesen beiden Molekülen können leicht polarisierbare H-Brücken auftreten, da der $\Delta pK_a = 2,0$ und damit das Potential noch nicht zu stark unsymmetrisch ist. Gerade durch das Mg^{2+} werden die in Kap. 4.3.9.1 diskutierten H-Brücken auf die eine mögliche zwischen den Zerfallsprodukten reduziert. Das Mg^{2+} schirmt gleichzeitig einen Teil der negativen Ladungen ab. Der relativ starke Anstieg bei 1900 cm^{-1} und der schwächere bei 1400 cm^{-1} scheinen auf solche H-Brücken hinzudeuten. Wasserstoff-Brücken von der Phosphatkette zum N_1 des Adenin sind wegen der größeren Unsymmetrie des Potentials nicht so leicht polarisierbar. Wie im nächsten Kapitel diskutiert werden wird, ist wiederum ein linearer Anstieg mit dem Hydrolysegrad zu registrieren, der den oben erwähnten Effekten überlagert ist.

4.3.4.2 $n=0,5$ Ausgangsprotonierung ($\text{MgK}_{1,5}\text{H}_2\text{O}_{5,5}\text{ATP}$) und $n=1$ Ausgangsprotonierung (MgKHATP)

Durch die Ausgangsprotonierung von $n=0,5$ bzw. $n=1$ werden γ -Phosphat und N_1 des Adenins bereits teilweise protoniert (s. Kap. 4.2.8). Bei der hydrolytischen Spaltung der Phosphatkette bleibt diese Anordnung weitgehend erhalten. Das läßt sich an den Banden und der pH-Abhängigkeit erkennen:

Die Banden (Abb. 31b,c; 32b, Tab. 7)

Die Adeninbanden werden durch die Hydrolyse nicht beeinflusst, d. h. der Protonierungszustand bleibt erhalten. Mit zunehmendem Hydrolysegrad ist ein starkes Ansteigen der $\nu_s \text{PO}_2^-$ -Schwingung bei 1080 cm^{-1} zu beobachten. Dadurch wird die antisymmetrische Valenzschwingung der PO_3^{2-} -Gruppe mit angehoben. Weiterhin sind die Banden des H_2PO_4^- zu erkennen ($\nu_{as} \text{PO}_2^-$ bei 1160 cm^{-1} , $\nu_{as} \text{P(OH)}_2$ bei 940 cm^{-1} überlagert mit der $\nu_{as} \text{P-O-P}$ des MgADP). Die Hydrolyse des einfach protonierten MgATP erfolgt also nach der Gleichung



pH-Abhängigkeit

Der pH bleibt fast konstant bei 4,4 (0,25 M) bzw. 4,1 (0,85 M). Daraus geht hervor, daß erstens das entstehende Proton am Hydrogenphosphat gebunden ist, zweitens der Protonierungszustand des Basenrestes und der endständigen Phosphatgruppe erhalten bleiben muß, da die pK_a -Werte von MgATP und MgADP fast identisch sind. Das Ergebnis ist also das gleiche wie oben.

Die Untergrundextinktion (Abb. 33b)

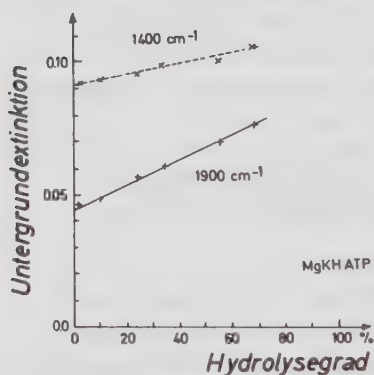


Abb. 33b: Verlauf der Untergrundextinktion bei 1900 cm^{-1} und 1400 cm^{-1} für 0,85 M MgKHATP in Abhängigkeit vom Hydrolysegrad

Wir beobachten mit zunehmendem Hydrolysegrad eine lineare Anhebung des Spektrenuntergrundes bei 1900 cm^{-1} und 1400 cm^{-1} , wobei derjenige bei 1400 cm^{-1} etwas flacher verläuft⁺). Dieses Verhalten ist bei allen Ausgangsprotonierungen des Mg^{2+} -Komplexes zu beobachten. Bei $n=1$ können H-Brücken zwischen Phosphat-O-Atomen gebildet werden, deren $\Delta pK_a = 2$ beträgt. Sie sind schon so weitgehend unsymmetrisch, daß im unteren Wellenzahlenbereich bei 1400 cm^{-1} keine Anhebung des Untergrundes zu erwarten ist. Wie die Abb. 33b zeigt, steigt aber der Spektrenuntergrund in diesem Bereich linear etwas an. Der Schluß liegt deshalb nahe, den linearen Anstieg bei allen Aus-

gangsprotonierungen der gleichen Ursache zuzuschreiben. Es liegt also das gleiche Problem wie beim K^+ -Salz des ATP vor. Da auch hier mit zunehmendem Hydrolysegrad primär H_2PO_4^- gebildet wird,

⁺) Wegen mangelnder Löslichkeit der Zerfallsprodukte (s. Kap. 4.3.4) konnte nur bis $\alpha = 66\%$ gemessen werden.

könnte dieses wiederum die Änderungen der Untergrundextinktion hervorrufen (zur Begründung s. Kap. 4.3.2).

Auch beim Mg^{2+} -Komplex konnte eine fehlerhafte Einstellung bei 4000 cm^{-1} , hervorgerufen durch sich verändernde Oberschwingungen, als Ursache ausgeschlossen werden (s. Kap. 4.3.3.2).

4.3.4.3 $n=1,5$ ($MgK_{0,5}H_{1,5}ATP$) und $n=2$ (MgH_2ATP) Ausgangs-protonierung

Die Banden (Abb. 31d,e, 32c, Tab. 7c)

Basenring und endständige Phosphatgruppe werden vollständig protoniert. Deshalb sind die Banden bei 1695 cm^{-1} und 1510 cm^{-1} des protonierten Adenins und bei 1095 cm^{-1} und 1080 cm^{-1} des protonierten γ -Phosphats gut zu sehen. Die Bande bei 1120 cm^{-1} ist hauptsächlich eine Ribose-Schwingung (s. Tab. 2) (69), die nicht mehr von der $\nu_{as} PO_3^{2-}$ überdeckt wird. Mit der Hydrolyse steigt wiederum die $\nu_s PO_2^-$ des Dihydrogenphosphats stark an. Außerdem nimmt die Bande der $\nu_{as} PO_2^-$ des ortho-Phosphats bei 1160 cm^{-1} mit der Hydrolyse deutlich zu.

Es kann also daraus geschlossen werden, daß die Hydrolyse des MgH_2ATP nach der Gleichung



verläuft.

Da sich $MgADP$ und ADP nur wenig im IR-Spektrum unterscheiden (s. Kap. 4.2), können keine Aussagen darüber gewonnen werden, in welchem Maße die Mg^{2+} -Komplexbildung aufrechterhalten oder verändert wird. Aus der Untersuchung der pH-Abhängigkeit der Hydrolyse kann man aber einige Ergebnisse gewinnen.

pH-Abhängigkeit

Der pH steigt mit dem Hydrolysegrad langsam an (0,85 M: von 1,9 auf 2,3; 0,25 M: von 2,3 auf 2,7). Da die pK_a -Werte der 3. und 4. Protonierungsstufe des Mg^{2+} -Komplexes von ATP und ADP nicht bekannt sind (s. Kap. 4.2.8), kann nur eine grobe Abschätzung der Einbeziehung der verschiedenen Akzeptoren erfolgen. Wie in Kap. 4.2.8 gezeigt wurde, muß auch beim höher protonierten $MgATP$ noch eine Wechselwirkung von Mg^{2+} zur Phosphatkette existieren. Dies drückt sich auch in dem gegenüber dem K^+ -Salz des ATP niedrigeren pH-Wert aus (s. Kap. 4.2.). Die Akzeptoren mit einem pK_a -Wert oberhalb 2 (endständiges Phosphat: 4,7; N_1 (Adenin): 4,0; $H_2PO_4^-$: 6,7) sind voll protoniert. Diejenigen unterhalb 2 müssen sich mit der Verschiebung des Gleichgewichts vom $MgATP$ zum $MgADP$ vergrößern, da der pH ansteigt. Das zeigt an, daß die Wechselwirkung des Mg^{2+} mit ADP nicht so stark ist wie mit ATP, da weniger Akzeptoren zur Komplexbildung vorhanden sind. Das H_2ADP^- ist nur mehr einfach negativ gebunden, so daß sich das zweiwertige Mg^{2+} schlechter anlagern kann. Die Mg^{2+} -Komplexbildung wird also teilweise aufgehoben. Die Bindungskonstante des Mg^{2+} an das $ADPH^{2-}$ beträgt nur noch 1,64 (88') gegenüber 2,24 beim $MgHATP^-$ (89). Man muß allerdings berücksichtigen, daß die endständige Phosphatgruppe noch nicht voll protoniert ist (s. Kap. 4.2.7). pK_a -Werte für das MgH_2ATP und MgH_2ADP^+ wurden bisher nicht publiziert.

Untergrundextinktion (Abb. 33c)

Die Untergrundextinktion steigt wiederum an. In Kap. 4.3.4.2 ist der lineare Anstieg diskutiert. Diesem ist bei 1900 cm^{-1} und 1400 cm^{-1} ein zusätzlicher Anstieg mit einem Maximum bei vollständigem Zerfall des MgH_2ATP überlagert. Solche Anstiege können auf relativ symmetrische Wasserstoff-Brücken zurückgeführt werden. Bei K_2H_2ATP (s. Kap. 4.3.9) traten H-Brücken der Art $(NH^+ \cdots ^-OP)$ auf. Sie sind auch hier die Ursache des zusätzlichen Anstiegs.

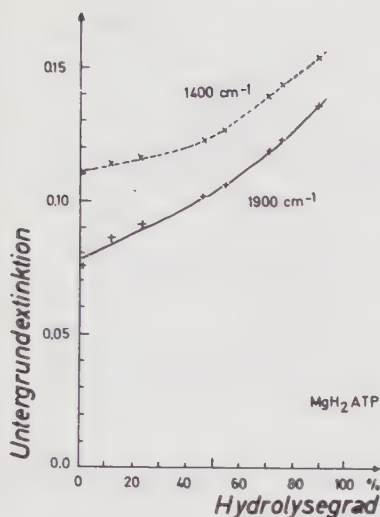


Abb. 33c: Verlauf der Untergrundextinktion bei 1900 cm^{-1} und 1400 cm^{-1} für $0,85\text{ M MgH}_2\text{ATP}$ in Abhängigkeit vom Hydrolysegrad

4.3.5 Zusammenfassung und Vergleich der Ergebnisse der Hydrolyse-reihen

In den Tabellen 6 und 7 sind die Ergebnisse der Hydrolyse-reihen von ATP und MgATP zusammengefaßt. Ein Vergleich der Resultate für die verschiedenen Ausgangsprotonierungen untereinander läßt den Einfluß von Protonen und Mg^{2+} erkennen. In Tab. 8 sind alle zu beobachtenden Effekte nochmals gemeinsam dargestellt. Insgesamt läßt sich folgendes entnehmen:

- 1) Der Adeninring verändert seinen Protonierungszustand mit der Hydrolyse nicht. Wenn er unprotoniert ist, bleibt er unprotoniert, entsprechend bleibt er protoniert, wenn er von vornherein protoniert ist.
- 2) Bis auf das ATP^{4-} wird bei allen Ausgangsprotonierungen primär H_2PO_4^- gebildet. Beim ATP^{4-} wird das Proton etwa gleich auf ADP und HPO_4^- verteilt.
- 3) Das Mg^{2+} hat auf das ATP^{4-} und dessen Hydrolyse mehrere Wirkungen:
 - a) Der pH liegt im physiologischen Bereich.
 - b) Die hydrolytische Spaltung wird etwas beschleunigt.

leicht polarisierbare H-Brücken	zerfällt in	$\text{ATP}^{4-} \xrightarrow{\text{mehrere Effekte (s.S.107)}} \text{MgATP}^{2-}$ PO_4^{3-} u. H_2PO_4^- ADP^{3-} + H_2PO_4^- ADPH^{2-} + HPO_4^{2-} Proton etwa gleichverteilt.	zerfällt in	leicht polarisierbare H-Brücken
$(\text{POH} \cdots \text{OP})^-$ zw. ADP^{3-} u. H_2PO_4^- $(\text{POH} \cdots \text{OP})^-$ zw. ADPH^{2-} u. HPO_4^{2-} $(\text{POH} \cdots \text{OP})^-$ Dimere $\Delta pK_a = 0$ bis $0,17$			$\text{MgADP}^- + \text{H}_2\text{PO}_4^-$ Mg^{2+} bewirkt, daß bei Hydrolyse PO_3^{2-} erhalten bleibt.	$(\text{POH} \cdots \text{OP})^-$ zwischen MgADP^- u. H_2PO_4^- $\Delta pK_a = 2$
$(\text{POH} \cdots \text{N})^-$ -Brücken (?)		$\text{ADPH}^{2-} + \text{H}_2\text{PO}_4^- \rightleftharpoons \text{ATPH}^{3-}$ N_1 wird protoniert $\text{ATPH}^{3-} \xrightarrow{\text{protoniert}} \text{MgATPH}^-$	$\text{MgADPH}^- + \text{H}_2\text{PO}_4^-$	$(\text{POH} \cdots \text{N})^-$ bzw. $(\text{NH}^+ \cdots \text{OP})^-$ -Brücken
$(\text{NH}^+ \cdots \text{OP})^-$ zw. H^+ADPH^- u. H_2PO_4^- u. H^+ADPH^- untereinander		$\text{H}^+\text{ADPH}^- + \text{H}_2\text{PO}_4^- \rightleftharpoons \text{H}^+\text{ATPH}^{2-}$ H^+ wird protoniert $\text{H}^+\text{ATPH}^{2-} \xrightarrow{\text{voll protoniert}} \text{MgH}^+\text{ATPH}^-$	$\text{MgH}^+\text{ADPH}^- + \text{H}_2\text{PO}_4^-$	$(\text{NH}^+ \cdots \text{OP})^-$ zwischen $\text{MgH}^+\text{ADPH}^-$ u. H_2PO_4^- u. $\text{MgH}^+\text{ADPH}^-$ untereinander

Tabelle 8: Zusammenfassung und Vergleich der Ergebnisse der Hydrolyse-reihen von Kap. 4.3

- c) Die endständige Phosphatgruppe bleibt unprotoniert.
Es entsteht überwiegend H_2PO_4^- .
- d) Es können sich H-Brücken zwischen MgADP^- und H_2PO_4^- bilden, die leicht polarisierbar sind.
- 4) Beim einfach protonierten ATP bewirkt das Mg^{2+} eine teilweise Protonierung des Basenrestes.
- 5) Beim zweifach protonierten ATP und MgATP können sich leicht polarisierbare H-Brücken vom Basenrest zu einer PO-Gruppe bilden.

4.3.6 Vergleich mit den früheren Ergebnissen

An dieser Stelle sollen die Messungen, ihre Ergebnisse und Deutungen von Hofmann und Zundel (17) (18) (35) mit den vorliegenden Resultaten verglichen werden. Hervorgerufen durch die nicht korrekte Ausgangssubstanz (s. Kap. 2.5.1) unterliefen den Autoren teilweise Fehleinschätzungen bei der Interpretation.

- 1) Aus den Protonierungsreihen von ATP und ADP wurde auf die Existenz leicht polarisierbarer Wasserstoff-Brücken der Art $\text{NH}^+ \cdots \text{N}$ zwischen den Adeninringen geschlossen (18). Wie in Kap. 4.2.4 und 4.2.6 nachgewiesen wurde, treten Brücken dieser Art sowohl beim ATP als auch beim ADP nicht auf. Da es sich um symmetrische H-Brücken handelt, müßte auch bei niedrigen Wellenzahlen (ca. 1400 cm^{-1}) eine Anhebung des Spektruntergrundes zu beobachten sein. Bei insgesamt 150% Protonierung würde man ein Maximum der Kontinuumsabsorption erwarten, wie es beim Purin auftritt (15). Beides ist bei den verwendeten Konzentrationen nicht der Fall. Aus den vorliegenden Untersuchungen hingegen geht hervor, daß leicht polarisierbare Brücken zwischen den Phosphatketten beim ATP (Kap. 4.2.4.4) und von $(\text{NH}^+ \cdots \text{OP})^-$ -Brücken zwischen Adeninring und Phosphatkette zweier ATP- bzw. ADP-Nachbarmoleküle gebildet werden (Kap. 4.2.4.5 und 4.2.6.2).

- 2) Für den Mg^{2+} -Komplex des ADP wurde von den Autoren eine "lokale Hydrolyse" postuliert, wie sie von Brintzinger (72) beim MgADP vorgeschlagen wurde. Die Kriterien (Verschiebung und Absenkung der Phosphatbanden durch Komplexbildung (72) sind zwar beim MgATP , aber nicht beim MgADP zu beobachten (Kap. 4.2.9). Die von Hofmann (18) beobachteten Bandenveränderungen sind, bedingt durch die fehlerhafte Ausgangssubstanz (Kap. 4.2.9) (MgHADP an Stelle von Mg_3ADP_2), auf das schon vorhandene Proton zurückzuführen.
- 3) Das von K & K gelieferte " Mg_2 "ATP war in Wirklichkeit ein MgH_2ATP (s. Kap. 2.5.1). Dadurch ergaben sich folgende ionale Zusammensetzungen bei den drei Hydrolysereihen von Hofmann (17):

- | | |
|---|---|
| I) anstatt $\text{Mg}_{0,5}\text{K}_{2,5}\text{H}_{0,5}\text{ATP}$: | $\text{Mg}_{0,5}\text{K}_2\text{HATP}$ |
| II) anstatt $\text{Mg}_{0,5}\text{K}_{1,8}\text{H}_{1,2}\text{ATP}$: | $\text{Mg}_{0,5}\text{K}_{1,3}\text{H}_{1,7}\text{ATP}$ |
| III) anstatt $\text{Mg}_{0,5}\text{K}_{1,5}\text{H}_{1,5}$: | $\text{Mg}_{0,5}\text{KH}_2\text{ATP}$ |

Es befindet sich also jeweils $1/2 \text{ H}^+$ mehr in den untersuchten Lösungen. Da bei allen Reihen nur halb soviel Mg^{2+} wie bei den vorliegenden Messungen vorhanden war, ist nur ein bedingter Vergleich möglich. Allerdings ist nicht zu erwarten, daß die Abweichungen zu den 1:1-Komplexen sehr groß sind. Hauptsächlich werden die pK_a -Werte der Phosphatkette durch das Mg^{2+} beeinflusst, so daß sie beim 1:2-Komplex weniger stark abgesenkt werden als beim 1:1-Komplex. Ein Vergleich der Hydrolysereihen von Hofmann (17) (35) mit den vorliegenden Reihen ergibt folgende Unterschiede:

- Das bei der Hydrolyse freigesetzte Proton wird primär am Hydrogenphosphat und nicht an der PO_3^{2-} -Gruppe des ADP gebunden.
- Der anfängliche Protonierungszustand des Basenrestes bleibt während der Hydrolyse weitgehend erhalten. Es findet also kein Austausch der Protonen vom Basenrest zugunsten der Phosphatkette statt.

- c) Der Anstieg der Untergrundextinktion bei 2600 cm^{-1} ist primär auf die Ausbildung von breiten Banden in diesem Bereich zurückzuführen (49) (50) (s. Kap. 3.2 und 4.2). Er läßt deshalb keinen Schluß auf $\text{NH}^+\cdots\text{N}$ -Brücken zwischen den Adeninringen zu. Anhebungen des Untergrundes bei 1900 cm^{-1} und 1400 cm^{-1} lassen vielmehr auf die Anwesenheit von $(\text{POH}\cdots\text{OP})^-$ - und $(\text{NH}^+\cdots\text{OP})^-$ -Brücken schließen (Kap. 4.10)
- d) Die Veränderungen an der Torsionsschwingung des Wassers innerhalb enger Hydrolysegradbereiche (17) (35) ist auf einen Artefakt zurückzuführen. Die Schichtdicke der verwendeten Küvette war nicht reproduzierbar und konstant während der Messung. Das läßt sich an den anderen Banden (H_2O -Valenz- und Scherenschwingung), die bei der verwendeten Konzentration ($170\text{ H}_2\text{O}/\text{ATP}$) relativ konstant bleiben, nachträglich kontrollieren.
- e) Es gibt kein sicheres Anzeichen dafür, daß beim Mg^{2+} -Komplex des ATP bei 60 - 70% Hydrolysegrad leicht polarisierbare Wasserstoff-Brücken der Art $(\text{POH}\cdots\text{OP})^-$ zwischen den 150% protonierten Phosphatmolekülen gebildet werden. Das Maximum der Untergrundextinktion an dieser Stelle beruht auf dem in d) erwähnten Meßfehler.

5. Zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse, Biologische Aspekte

- 1) Die Untersuchungen von Adenin-Nukleotiden in wäßriger Lösung haben gezeigt, daß gerade bei den unprotonierten Molekülen starke Wasserstoff-Brücken zum Hydratwasser geknüpft werden (s. Kap. 4.2.4). Solche H-Brücken treten auch beim ortho-Phosphat auf (16) (Kap. 3.2). Sie werden also zwischen den Phosphat-O-Atomen und H_2O gebildet (s. Kap. 4.2.4.1). Mit der Protonierung der Phosphat-Gruppen beim ADP und ATP tauchen die OH-Banden der Schwingungen in den $POH \cdots OH_2$ bzw. $(POH \cdots OP)^-$ Brücken auf (Kap. 4.2.4.6). Es müssen recht kräftige Brücken sein, da die Banden weit zu kleineren Wellenzahlen verschoben sind (49) (50). Auch bei der Protonierung des Basenrestes treten solche Banden auf, die auf $(NH^+ \cdots OP)^-$ bzw. $(NH^+ \cdots OH_2)$ -Brücken schließen lassen.

Zusammenfassend zeigt sich, daß eine starke Wechselwirkung des ATP und ADP zum umgebenden Wasser besteht. Die IR-Spektren der hydrolysierenden Substanzen lassen allerdings erkennen, daß diese starke Wechselwirkung auch von den Zerfallsprodukten aufrechterhalten wird. Es läßt sich also kein Beweis für die Hypothese von George et al. (6) finden, daß unterschiedliche Hydratationsenthalpien für einen Teil der freien Enthalpie der Hydrolyse verantwortlich sind. Das widerspricht nicht den Ausführungen von George, da es sich nur um kleine Effekte handelt (wenige kcal/mol), die sich im IR-Spektrum bei den gemessenen Konzentrationen (25 - 60 H_2O /Adenin-Nukleotid) nicht bemerkbar machen müssen.

- 2) Im sauren Milieu (pH = 1 - 3) werden die negativen Ladungen an der Phosphatkette durch Protonen besetzt. Die H-Brücken untereinander und zum Wasser sind leicht polarisierbar. Es kann keine Unterscheidung zwischen den

Bindungsplätzen an α -, β - und γ -Phosphat getroffen werden. Alle Akzeptoren scheinen bezüglich der Ausbildung der leicht polarisierbaren Wasserstoff-Brücken gleichberechtigt zu sein. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, warum beim ATP und ADP sowie beim H_3PO_4 trotz der Unsymmetrie des Potentials eine Kontinuumsabsorption über so einen großen Wellenzahlenbereich ($3000 - 1400\text{ cm}^{-1}$) beobachtet wird.

- 3) Auch bei Deprotonierung der Ribose am 2'-OH oder 3'-OH treten leicht polarisierbare Wasserstoff-Brücken auf (Kap. 4.2). Betrachtungen am Kalottenmodell zeigen, daß eine innermolekulare H-Brücke, wie sie von Izatt et al. (56) postuliert wurde, nur mit sehr gebogenen Valenzen verwirklichtbar ist. Außerdem sollte sie nicht leicht polarisierbar sein, da über das C-C-Gerüst ein Ladungsausgleich bei Protonenfluktuation stattfinden kann und so die Polarisierbarkeit stark herabdrückt. Durch verschiedene Ribose-Konformationen (66) (86) (97) können sich allerdings auch unterschiedliche Abstände ergeben, die innermolekulare H-Brücken erlauben (z. B. zum N_3 des Adenins). Z. Zt. werden SCF-Berechnungen der Zuckerkonformation und Wechselwirkungen mit der Umgebung durchgeführt (105), die auch zur Klärung dieses Punktes beitragen können.
- 4) Im physiologischen pH-Bereich bilden sich beim ATP zunächst leicht polarisierbare symmetrische Wasserstoff-Brücken zwischen den Phosphatketten (Kap. 4.2). Die starken negativen Ladungen werden dabei von den eingelagerten Kationen (K^+ , Na^+ , Mg^{2+}) abgeschirmt. Eine pH-Verschiebung ins saure Milieu, d. h. eine Protonierung, bewirkt, daß diese Brücken wieder aufgebrochen werden und die POH-Gruppen Brücken zum Basenrest knüpfen können. Diese werden bei weiterer Protonenzugabe zugunsten von $(NH^+ \cdots OP^-)$ -Brücken zurückgedrängt. Die verbleibenden

POH-Gruppen können H-Brücken zu andern PO^- -Gruppen knüpfen.

Durch die vielen, in der Akzeptorstärke nahe beieinander liegenden Gruppen bilden sich also über einen großen pH-Bereich unterschiedliche Wasserstoff-Brücken von ATP- bzw. ADP-Molekülen untereinander ⁺). Die von Kennard et al. (66) (s. Kap.4.2.2) beobachteten Wasserstoff-Brücken in Kristallen von $\text{Na}_2\text{H}_2\text{ATP} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ treten also auch in konzentrierten, wäßrigen Lösungen von ATP auf.

Geringe Verschiebungen des pH bewirken also große Veränderungen der zwischenmolekularen Wechselwirkungen, besonders der H-Brücken-Bindung.

- 5) Bisher ist der Einfluß des Mg^{2+} noch nicht betrachtet worden. Die 1:1-Komplexbildung mit den Adenin-Nukleotiden hat mehrere Effekte:
 - a) Die endständige Phosphatgruppe ist im physiologischen pH-Bereich vollständig deprotoniert. Sie kann dadurch nur als Wasserstoff-Brücken-Akzeptor auftreten (Kap. 4.2.1).
 - b) Auch bei Protonierung der Phosphatkette bleibt eine Wechselwirkung des Mg^{2+} mit den Phosphatgruppen aufrechterhalten.
 - c) Die Geschwindigkeitskonstante der Hydrolyse des unprotonierten ATP wird durch das Mg^{2+} auf etwa das doppelte beschleunigt.
 - d) Beim Zerfall von MgATP^{2-} in MgADP^- bleibt die endständige Phosphatgruppe unprotoniert. Es entsteht H_2PO_4^- . (Beim ATP^{4-} entsteht auch HPO_4^{2-} und ADPH^{3-}).

⁺) Daneben können sich auch verschiedene Anordnungen der Adeninringe ergeben, da die "Stacking"-Energien von der Protonierung des Basenrestes abhängig sind (101).

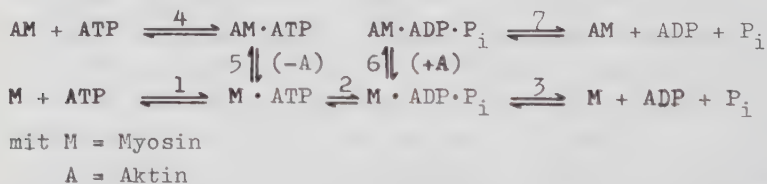
Im Vergleich mit anderen zweiwertigen Kationen ist gerade das Mg^{2+} durch mehrere Eigenschaften ausgezeichnet:

- α) Kleiner Ionenradius (0,69 Å) bei hoher positiver Ladung (81);
 - β) Hohe Bindungskonstante nur an die Phosphatkette (β- und γ-Phosphat);
 - γ) Geringe katalytische Eigenschaften;
 - δ) Endständige $-PO_3^{2-}$ -Gruppe wirkt nur als starker Wasserstoff-Brücken-Akzeptor.
- 5) Am Beginn der Hydrolyse des $MgATP^{2-}$ verschiebt sich der pH vom alkalischen ins saure Milieu und bleibt dann über den gesamten Hydrolysegradbereich fast konstant (Kap. 4.3.2) Die Zerfallsprodukte bilden also ein Puffersystem. Das gilt auch für die anderen Ausgangsprotonierungen des ATP und $MgATP$. Dies ist besonders interessant im physiologischen pH-Bereich. Herbst und Piontek (104) konnten zeigen, daß bei der Muskelkontraktion das intrazelluläre Milieu saurer wird.
- 7) Bei der Hydrolyse des ATP ist vor allen Dingen die Verteilung der Protonen auf die verschiedenen Akzeptoren und damit die Möglichkeit, Wasserstoff-Brücken auszubilden, interessant. Ein für alle Ausgangsprotonierungen zutreffendes Ergebnis ist, daß der Protonierungszustand am Basenrest durch die Hydrolyse nicht verändert wird. Die entstehenden Protonen verteilen sich auf die Phosphatgruppen. Wasserstoff-Brücken-Bindungen, die das Adenin eingegangen ist, werden also durch eine Protonierung oder Deprotonierung nicht zerstört. - Bis auf einen Fall, nämlich das ATP^{4-} , wird bei der Hydrolyse Dihydrogenphosphat gebildet. Beim ATP^{4-} entsteht zu etwa gleichen Teilen Dihydrogen- und Hydrogenphosphat. Dadurch wird das endständige Phosphat des ADP teilweise protoniert. (Der Einfluß des Mg^{2+} auf das ATP^{4-} wird weiter unten diskutiert). Das Bestreben, Wasserstoff-Brücken auszubilden, ist bei allen

Zerfallsprodukten stark ausgeprägt. Da die pK_a -Werte der beteiligten Gruppierungen nahe beieinander liegen, wird das Potential der Wasserstoff-Brücken symmetrisch oder noch so symmetrisch, daß die Brücken leicht polarisierbar sind.

Im physiologischen pH-Bereich können sich symmetrische, leicht polarisierbare H-Brücken zwischen dem endständigen Phosphat des ADP und dem anorganischen Phosphat ausbilden. Das Mg^{2+} bewirkt, daß das Proton bevorzugt am P_i gebunden wird. Dadurch bleibt die endständige Phosphatgruppe des ADP unprotoniert. Der Protonierungszustand hat natürlich Konsequenzen auf die Ladungsverteilung, die Mesomerie der P-O-Bindungen und evtl. die Konformation. Das könnte beim **enzymatischen** Prozeß eine Rolle spielen. Außerdem erhält das Potential der H-Brücke einen etwas unsymmetrischen Verlauf.

Wechselwirkungen zwischen den Zerfallsprodukten des ATP wurden von Lymn und Taylor (107) bei der Muskelkontraktion postuliert. Die enzymatische Spaltung des ATP durch die ATPasen des Myosins soll nach folgendem, noch vereinfachten Schema verlaufen (aus (107)):



Er ist verbunden mit den verschiedenen Stufen beim Zyklus der "cross-bridges" (108):

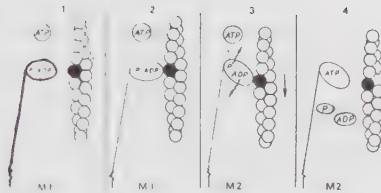


Abb. 34 Schematische Darstellung der Stufen in der zyklischen Bewegung der "cross-bridges" (aus (108))

Der Komplex $M \cdot ADP \cdot P_i$ ist der bei weitem stabilste. Die Geschwindigkeitskonstante k_2 beträgt $0,05 \text{ sec}^{-1}$. Erst das Aktin beschleunigt den Trennungsprozeß ($k_6 = 3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$; $k_7 = 10 - 20 \text{ sec}^{-1}$). Ein $M \cdot ADP$ Komplex konnte nachgewiesen werden (109) (110). Eine Wechselwirkung des ADP mit dem P_i könnte über die oben diskutierten leicht polarisierbaren Wasserstoff-Brücken geschehen, wobei die restlichen Akzeptoren (Adenin, Ribose, α -Phosphat des ADP) frei bleiben für zwischenmolekulare Wechselwirkungen zum Enzym. Da an das F-Aktin ebenfalls ADP gebunden ist (111), können im Aktomyosin-Komplex AM H-Brücken zwischen den Phosphatgruppen von ADP an F-Aktin und ATP am Myosin auftreten. Im Modell von Davies (112) soll allerdings Ca^{2+} diese Bindung vermitteln. Im Insektenflugmuskel kann aber bei den selbsterzeugten Oszillationen der Ein- und Ausfluß von Ca^{2+} nicht mehr den Zyklus steuern (113), so daß andere Bindungen den AM-Komplex bewirken müssen.

Wasserstoff-Brücken, die in wäßrigen Lösungen von Adenin-Nukleotiden und hydrolysierendem ATP mit und ohne Mg^{2+} auftreten, könnten also in biologischen Systemen eine wesentliche Rolle spielen.

6. Zusammenfassung

Es wurde die Hydrolyse von ATP als K^+ -Salz und 1:1-Komplex mit Mg^{2+} in wäßriger Lösung infrarotspektroskopisch untersucht.

- 1) Dazu wurden im ersten Teil der Arbeit die Ausgangssubstanzen ATP und MgATP und die Zerfallsprodukte ADP und MgADP stufenweise protoniert und die IR-Spektren quantitativ ausgewertet. Es konnte gezeigt werden, daß
 - a) bei den unprotonierten Adenosinphosphaten starke Wasserstoff-Brücken zum Hydratwasser gebildet werden,
 - b) im physiologischen pH-Bereich leicht polarisierbare Wasserstoff-Brücken der Art $(POH \cdots OP)^-$ zwischen den endständigen Phosphatgruppen des ATP auftreten,
 - c) im schwach sauren Medium zunächst $(POH \cdots N)$ -Brücken, bei weiterer Protonierung $(NH^+ \cdots ^-OP)$ -Brücken zwischen der Phosphatkette und dem Adeninring geknüpft werden. Diese Brücken sind schon relativ unsymmetrisch, aber noch leicht polarisierbar.
 - d) im stark sauren Milieu die Wasserstoff-Brücken von der protonierten Phosphatkette zum Hydratwasser extrem leicht polarisierbar sind. Die Akzeptoren an den verschiedenen Gruppen der Phosphatkette sind dabei gleichberechtigt.
- 2) Im zweiten Teil der Arbeit wurde die nicht-enzymatische Hydrolyse von ATP und MgADP in wäßriger Lösung bei verschiedenen Ausgangsprotonierungen untersucht:
 - a) Da die Lösungen nicht gepuffert waren, konnte sich der pH frei einstellen. Bei Beginn der Hydrolyse der unprotonierten Substanzen verschiebt sich der pH ins Saure. Beim weiteren Zerfall bleibt der pH dann fast konstant. Das gilt auch für alle anderen Ausgangsprotonierungen. Die Mischungen aus Ausgangssubstanzen und Zerfallsprodukten bilden also über einen großen Hydrolysegradbereich ein Puffersystem.

- b) Der Protonierungszustand am Adeninring wird durch die Hydrolyse nicht beeinflusst.
 - c) Beim Zerfall des ATP^{4-} wird das ADP und das Hydrogenphosphat etwa zu gleichen Teilen protoniert. Beim MgATP^{2-} bleibt die endständige Phosphatgruppe unprotoniert. Es können sich im physiologischen pH-Bereich leicht polarisierbare Wasserstoff-Brücken zwischen den Zerfallsprodukten bilden. Die Rolle solcher H-Brücken bei biologischen Prozessen, z. B. bei der Muskelkontraktion, wird diskutiert.
 - d) Bei allen übrigen Ausgangsprotonierungen wird Dihydrogenphosphat gebildet, das ebenfalls leicht polarisierbare Wasserstoff-Brücken zum ADP bilden kann.
- 3) Die Komplexbildung des ATP und ADP mit Mg^{2+} bewirkt, daß
- a) die endständige Phosphatgruppe des ATP im physiologischen pH-Bereich vollständig deprotoniert ist,
 - b) bei der Hydrolyse des MgATP^{2-} das entstehende Proton am Hydrogenphosphat und nicht am MgADP^- gebunden wird.
- Mögliche Konsequenzen für biologische Vorgänge werden diskutiert.

Literatur

- (1) J.Rosing und E.C.Slater: Biochim.Biophys.Acta 267, 275 (1972)
- (2) T.L.Hill und M.F.Morales: J.Am.Chem.Soc. 73, 1656 (1951)
- (3) A.Pullman und B.Pullman: "Quantum Biochemistry", Interscience, New York (1963)
- (4) P.Oesper: Arch.Biochem.Biophys. 27, 255 (1950)
- (5) L.Pauling: Chem.Brit. 6, 468 (1970)
- (6) P.George, R.J.Witonsky, M.Trachtman, C.Wu, W.Dowart, L.Richmann, W.Richman, F.Shurayh und B.Lentz: Biochim. Biophys.Acta 223, 1 (1970)
- (7) S.V.Perry: Progr.Biophys.Mol.Biol. 17, 325 (1967)
- (8) M.Tetas und J.M.Lowenstein: Biochem. 2, 350 (1963)
- (9) D.L.Miller und F.N.Westheimer: J.Am.Chem.Soc. 88, 1511 (1966)
- (9a) I.Feldman in: "Jerusalem Symp. on Quantum Chemistry and Biochemistry" (Ed. E.D.Bergman und B.Pullman), IV, S. 528, Academic Press New York (1972)
- (10) F.S.Parker: "Applications of Infrared Spectroscopy in Biochemistry , Biology and Medicine," A.Hilger, London (1971)
- (11) G.Zundel: "Hydration and Intermolecular Interaction", Academic Press, New York (1969) Mir, Moskau (1972)
- (12) G.Zundel in: "The Hydrogen Bond", Recent Developments in Theory and Experiment, North Holland Publ.Co. (1975)
- (13) E.G.Weidemann und G.Zundel: Z.Naturforschg. 25a, 627 (1970)
- (14) R.Janoschek, E.G.Weidemann, H.Pfeiffer und G.Zundel: J.Am.Chem.Soc. 94, 2387 (1972)
- (15) W.Seßler und G.Zundel: Chem.Phys.Letters 14, 356 (1972)
- (16) D.Schiöberg, K.P.Hofmann und G.Zundel: Z.physik.Chem. NF 90, 181 (1974)
- (17) K.P.Hofmann und G.Zundel: Z.Naturforschg. 29c, 29 (1974)
- (18) K.P.Hofmann und G.Zundel: Z.Naturforschg. 29a, 19 (1974)
- (19) H.Wagner und J.Bohm: Spectrochim.Acta 21, 427 (1965)
- (20) W.Reitzenstein: Naturw. 52, 54 (1965)
- (21) I.Kampschulte -Scheuing: Dissertation, Universität München (1969)

- (22) A.Hayd: persönliche Mitteilung
- (23) G.Zundel, A.Murr und G.-M.Schwab: Z.Naturforschg. 17a, 1027 (1962)
- (24) R.G.J.Miller: Laboratory Methods in Infrared Spectroscopy, Heyden and Son, London (1965)
- (25) K.P.Hofmann und G.Zundel: Rev.Sci.Instr. 42, 1726 (1971)
- (26) N.J.Harrick: "Internal Reflection Spectroscopy", Interscience, New York (1967)
- (27) J.Fahrenfort: Spectrochim.Acta 17, 698 (1961)
- (28) R.P.Young und R.N.Jones: Chem.Rev. 71, 219 (1971)
- (29) J.Zerfowski: pers.Mitteilung
- (30) Katalog 1974 der Fa. Sigma Chem.Comp.St.Louis U.S.A.
- (31) G.Jander und E.Blasius: "Einführung in das anorgan.-chem. Praktikum", Verlag S.Hirzel, Stuttgart (1965)
- (32) F.Feigl: "Tüpfelanalyse I", Akademische Verlagsgesellschaft Frankfurt/Main, 4. Aufl. (1960)
- (33) A.L.Lehninger: "Bioenergetik", Verlag G.Thieme, Stuttgart (1970)
- (34) K.P.Hofmann: Dissertation, Universität München (1972)
- (35) K.P.Hofmann und G.Zundel: Experientia 30, 139 (1974)
- (36) R.M.Bock, Nan-Sing Ling, S.A.Morell und S.H.Lipton: Arch.Biochem.Biophys. 62, 253 (1956)
- (37) B.Keil und Z.Šormová: "Laboratoriumstechnik für Biochemiker", Akad.Verlagsanst. Leipzig (1965)
- (38) H.Mattenheimer: "Die Theorie des enzymatischen Tests", Boehringer, Mannheim (1971)
- (39) Testfibel der Fa. Boehringer Mannheim (1971)
- (39a) Anleitung zum Infrarot-Gitter-Spektrophotometer, Modell 325, Perkin-Elmer Überlingen
- (40) R.Suhrmann und F.Breyer: Z.physik.Chem. B 23, 193 (1933)
- (41) T.Ackermann: Z.physik.Chemie NF 27, 253 (1961)
- (42) W.Seßler und G.Zundel: Z.physik.Chemie NF 79, 180 (1972)
- (43) R.Lindemann und G.Zundel: JCS Faraday II 68, 979 (1972)
- (44) D.Schiöberg und G.Zundel: JCS Faraday II 69, 771 (1969)
- (45) D.Schiöberg und G.Zundel: in Vorbereitung
- (46) A.H.Narten in: "Proc.Internat.Symp. On the struct. of Water and Aqueous Solutions" (Ed. W.A.P.Luck), Verlag Chemie, Weinheim (1975)

- (47) A.Albert und E.P.Serjeant: "Ionization Constants of Acids and Bases", Methuen & Co. London (1962)
- (48) L.G.Sillén, A.E.Martell: "Stability Constants of Metall-Ion Complexes", The Chemical Society, London (1964)
- (49) D.Hadži und N.Kobilarov: J.Chem.Soc. A, 439 (1966)
- (50) D.Hadži und S.Bratož in: "The Hydrogen Bond", Recent Developments in Theory and Experiment (Ed. P.Schuster, C.Sandorfy und G.Zundel), North Holland Publ. Co. (1975)
- (51) A.C.Chapman und L.E.Thirlwell: Spectrochim.Acta 20, 937 (1964)
- (52) R.C.Phillips: Chem.Rev. 66, 501 (1966)
- (53) R.M.Izatt, J.J.Christensen und J.H.Rytting: Chem.Rev. 71, 439 (1971)
- (54) P.George: Progr.Biophys. 10, 1 (1960)
- (55) H.M.Kalckar: Chem.Revs. 28, 71 (1941)
- (56) R.M.Izatt, L.D.Hansen, J.H.Rytting und J.J.Christensen: J.Am.Chem.Soc. 87, 2760 (1965)
- (57) R.C.Phillips, P.George und R.J.Rutman: Biochem. 2, 501 (1963)
- (58) R.C.Phillips, P.George und R.J.Rutman: J.Am.Chem.Soc. 88, 2631 (1966)
- (59) R.C.Phillips, P.George und R.J.Rutman: J.Biol.Chem. 224, 3330 (1969)
- (60) R.M.Smith und R.A.Alberty: J.Phys.Chem. 60, 180 (1956)
- (61) R.M.Smith und R.A.Alberty: J.Am.Chem.Soc. 78, 2376 (1956)
- (62) S.Weitzel und T.Spehr: Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 313, 212 (1958)
- (63) V.Hadschin und H.Brintzinger: Helv.chim.Acta 45, 1037 (1962)
- (63a) S.Watanabe, L.Evenson und I.Gulz: J.Biol.Chem. 238, 324 (1963)
- (64) A.Epp, T.Ramasarma und L.R.Wetter: J.Am.Chem.Soc. 80, 724 (1958)
- (65) O.Kennard, N.W.Isaacs, J.J.Coppola, A.J.Kirby, S.G.Warren, W.D.S.Motherwell, D.G.Watson, D.L.Wampler, D.H.Chenery, A.C.Larson, K.A.Kerr und L.Riva di Sanserverino: Nature 225, 333 (1970)

- (66) O.Kennard, E.W.Isaacs, W.D.S.Motherwell,
D.G.Watson in: "Jerusalem Symposium on Quantum
Chemistry and Biochemistry", (Ed. E.D.Bergman und
D.Pullman), IV, S. 114 Academic Press, New York (1972)
- (67) L.Rimai, T.Cole, J.L.Parsons, J.T.Hickmott Jr. und
E.B.Carew: *Biophys.J.* 9, 320 (1969)
- (67a) L.Rimai und M.E.Heyde: *Biochem.Biophys.Res. Commun.*
41, 313 (1970)
- (67b) L.Rimai, M.E.Heyde und E.B.Carew: *Biochem.Biophys.*
Res.Comm. 38, 231 (1970)
- (68) M.E.Heyde und L.Rimai: *Biochem.* 10, 1121 (1971)
- (69) T.Shimanouchi, M.Tsuboi und Y.Kyogoku in: "Advances
in Chemical Physics" (Ed. J.Duchesne), VII, S. 435,
Interscience New York (1964)
- (70) F.L.Khalil und T.L.Brown: *J.Am.Chem.Soc.* 86, 5113 (1964)
- (71) H.Brintzinger: *Helv.Chim.Acta* 48, 47 (1965)
- (72) H.Brintzinger: *Biochim.Biophys.Acta* 77, 343 (1963)
- (73) H.Brintzinger: *J.Am.Chem.Soc.* 87, 1805 (1965)
- (74) J.J.Fox und A.E.Martin: *Proc.Roy.Soc. A* 174, 234 (1940)
- (75) K.Kölkenbeck und G.Zundel: in Vorbereitung
- (76) L.J.Bellamy: "The infra-red Spectra of Complex Molecules",
Methuen & Co., London (1958)
- (77) W.Bues und H.W.Cehrke: *Z.anorg.allg.Chem.* 228, 291 (1956)
- (78) A.Simon und H.Richter: *Z.anorg.allg.Chem.* 301, 154 (1959)
- (79) E.Steger und K.Herzog: *Z.anorg.allg.Chem.* 331, 169 (1964)
- (79a) E.Steger und C.Fischer-Bartelk: *Z.anorg.allg.Chem.* 338,
15 (1965)
- (80) F.F.Bentley, L.D.Smithson und A.L.Rozek: "Infrared
Spectra and Characteristic Frequencies $\sim 700 - 300 \text{ cm}^{-1}$ ",
Interscience New York (1968)
- (81) H.M.Rauen: "Biochemisches Taschenbuch" 2.Teil, 2.Aufl.
Springer-Verlag Berlin (1964)
- (82) B.Witkop: *J.Am.Chem.Soc.* 76, 5597 (1954)
- (83) A.Lautié und A.Novak: *J.Chim.Physique* 71, 415 (1974)
- (84) A.Novak und A.Lautié: *Nature* 216, 1202 (1967)
- (85) P.A.Giguère und K.B.Harvey: *Canad.J.Chem.* 34, 798 (1956)

- (86) H.D.Lüdemann, O.Röder, E.Westhof, E.v.Goldhammer und A.Müller: Biophys.Struct.mechanism 1, 121 (1975)
- (87) C.E.Bugg in: "Jerusalem Symp. on Quantum Chem. and Biochem." (Ed. E.D.Bergman und B.Pullman) IV, S. 178, Academic Press New York (1972)
- (88) M.M.Taqi Khan und A.E.Martell: J.Am.Chem.Soc. 89, 5585 (1967)
- (89) M.M.Taqi Khan und A.E.Martell: J.Am.Chem.Soc. 88, 668 (1966)
- (90) C.M.Frey und J.E.Stuehr: J.Am.Chem.Soc. 94, 8898 (1972)
- (91) C.M.Frey, J.L.Banyasz und J.E.Stuehr: J.Am.Chem.Soc. 94, 9198 (1972)
- (92) J.L.Wood: J.Mol.Struct. 12, 283 (1972)
- (92a) J.L.Wood: J.Mol.Struct. 13, 141 (1972)
- (93) L.C.Thomas und R.A.Chittenden: Spectrochim.Acta 20, 467 (1964)
- (94) L.C.Thomas und R.A.Chittenden: Spectrochim.Acta 20, 489 (1964)
- (95) T.Funck, Göttingen: persönliche Mitteilung
- (96) D.G.Watson, R.M.Sweet und R.E.Marsh: J.Mol.Biol. 19, 573 (1965)
- (97) M.Sundaralingam: Biopolymers 7, 821 (1969)
- (98) S.T.Rao und M.Sundaralingam: J.Am.Chem.Soc. 92, 4963 (1970)
- (99) L.B.Nanninga: Biochem.Biophys.Acta 54, 338 (1961)
- (100) P.W.Schneider und H.Brintzinger: Helv.Chim.Acta 47, 1717 (1964)
- (101) F.Jordan und H.D.Sostman: J.Am.Chem.Soc. 94, 7898 (1972)
- (102) G.C.Pimentel: "International Workshop on the Role of Hydrogen Bond in Proteins", Rom (1974)
- (103) R.Lumry und S.Rajender: Biopolymers 9, 1125 (1970)
- (104) M.Herbst und P.Piontek: Pflügers Arch. 335, 213 (1972)
- (105) G.Zundel: persönliche Mitteilung
- (106) A.A.Frost und R.G.Pearson: "Kinetik und Mechanismen homogener chemischer Reaktionen", Verlag Chemie, Weinheim (1964)

- (107) R.W.Lymn und E.W.Taylor: Biochem. 10, 4617 (1971)
- (108) J.B.Leigh, K.C.Holmes, H.G.Mannherz, G.Rosenbaum, F.Eckstein und R.Goody in: Cold spring Harbor Symp. on Quantitative Biology, XXXVII, S. 443 (1972)
- (109) S.B.Marston und R.T.Tregear: Nature New Biol. 235, 23 (1972)
- (110) B.Kiely und A.Martonosi: Biochim.Biophys.Acta 172, 158 (1969)
- (111) A.G.Szent-Györgyi und G.Prior: J.Mol.Biol. 15, 515 (1966)
- (112) R.E.Davies: Nature 199, 1068 (1963)
- (113) J.W.S.Pringle: Progr.Biophys. 17, 1 (1967)

L e b e n s l a u f

Name: Michael M a t t h i e s

Geburtstag: 25. 8. 1944

Geburtsort: Lüdenscheid, Nordrhein-Westfalen

Staats-
angehörigkeit: deutsch

Familienstand: verheiratet, ein Kind

Eltern: Architekt Dipl.-Ing. Hans Matthies und
Frau Helma, geb. Lange
5880 Lüdenscheid, Westfalenstr. 8

Schulbildung: 1951 - 55 Volksschule Lüdenscheid
1955 - 64 Zeppelin-Gymnasium, Lüdenscheid
(mathematisch-naturwissenschaftlich)
1964 Abitur

Wehrdienst: 1964 - 66 Wehrdienst in Rheine/Westf.

Hochschule: 1966 - 68 Studium der Physik an der
Universität Münster
1968 Diplom-Vorexamen in Physik
1968 - 71 Studium der Physik an der
Universität München
1971 Diplom in Physik (Diplomarbeit am
Institut für medizinische Optik:
Untersuchungen zum Einfluß der Aberrationen
des menschlichen Auges auf den Akkommoda-
tionsablauf)
1972 - 75 Doktorarbeit am Physikalisch-Chemischen
Institut der Universität München bei
Prof.Dr.Georg Zundel

